




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización y Modelización Teórica de Nuevos Agentes Quelantes análogos al EDDHA para su Uso como Fertilizantes

	X	R ₁	R ₂	R ₃
<i>o,o</i> -EDDHA	(CH ₂) ₂	-OH	-H	-H
PDDHA	(CH ₂) ₃	-OH	-H	-H
BDDHA	(CH ₂) ₄	-OH	-H	-H
<i>p</i> -XDDHA	H ₂ C-  -CH ₂	-OH	-H	-H
EDDH4MA	(CH ₂) ₂	-OH	-CH ₃	-H
EDDH5MA	(CH ₂) ₂	-OH	-H	-CH ₃
EDDHSA	(CH ₂) ₂	-OH	-H	-SO ₃ H
<i>o,p</i> -EDDHA	(CH ₂) ₂	-OH y -H	-H	-H
<i>p,p</i> -EDDHA	(CH ₂) ₂	-H	-OH	-H
EDDMtxA	(CH ₂) ₂	-OCH ₃	-H	-H

UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE
MADRID
BIBLIOTECA
CIENCIAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA MADRID
REGISTRO GENERAL

Entrada 01 N°. 200300008857
09/06/03 12:28:58

Reg. F. C. 31.765

TESIS DOCTORAL
Felipe Yunta Mezquita
Madrid, 2003

ABREVIATURAS DE AGENTES QUELANTES

<i>o,o</i> -EDDHA	Ácido etilendiamino di(<i>o</i> -hidroxifenilacético)
<i>o,p</i> -EDDHA	Ácido etilendiamino N-(<i>o</i> -hidroxifenilacético)-N'-(<i>p</i> -hidroxifenilacético)
<i>p,p</i> -EDDHA	Ácido etilendiamino di(<i>p</i> -hidroxifenilacético)
EDDH4MA	Ácido etilendiamino di(<i>o</i> -hidroxi-4-metilfenilacético)
EDDH5MA	Ácido etilendiamino di(<i>o</i> -hidroxi-5-metilfenilacético)
EDDH6MA	Ácido etilendiamino di(<i>o</i> -hidroxi-6-metilfenilacético)
EDDH4,6MA	Ácido etilendiamino di(<i>o</i> -hidroxi-4,6-dimetilfenilacético)
EDDHSA	Ácido etilendiamino di(<i>o</i> -hidroxi-5-sulfonilfenilacético)
EDDCHA	Ácido etilendiamino di(5-carboxi-2-hidroxifenilacético)
PDDHA	Ácido pentilendiamino di(<i>o</i> -hidroxifenilacético)
BDDHA	Ácido butilendiamino di(<i>o</i> -hidroxifenilacético)
<i>p</i> -XDDHA	Ácido <i>p</i> -xililendiamino di(<i>o</i> -hidroxifenilacético)
EDDMtxA	Ácido etilendiamino di(<i>o</i> -metoxifenilacético)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
TMDTA	Ácido trimetilendiaminotetraacético
DTPA	Ácido dietilentriaminopentaacético
EGTA	Ácido-2,2'-etilendioxi(di(etilendiamino))-N,N,N',N'-tetraacético
HEDTA	Ácido 2-hidroxietil-etilendiaminotriacético
EDDA	Ácido etilendiamino
HBED	Ácido etilendiamino N,N'-(<i>o</i> -hidroxifenil)-N,N'-(diacético)
BHTDA	Ácido trimentilendiamino N,N'-(<i>o</i> -hidroxifenil)-N,N'-(diacético)
TMPPHG	Ácido trimetilendiamino di(<i>o</i> -hidroxi-3,5-dimetilacético)
SHBED	Ácido etilendiamino N,N'-(<i>o</i> -hidroxi-5-sulfonilfenil)-N,N'-(diacético)
HPED	Ácido N,N'-di(<i>o</i> -hidroxifenil)etilendiamina-N,N'-(diacético)
HBEP	Ácido etilendiamino N,N'-(<i>o</i> -hidroxifenil)-N,N'-(dipropiónico)
L3	Ácido etilendiamino N-(<i>o</i> -hidroxifenilacético)-N'-(fenilacético)
CDTA	Ácido trans-ciclohexano-1,2-diaminotetraacético
EN	Etilendiamina
TN	Trimetilendiamina
MES	Ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico

Es mucha la responsabilidad que en este momento recae sobre esta pluma a la hora de nombrar todos los "coautores" del presente trabajo. Debido a la gran complejidad del asunto, confío y sobre todo deseo que si a alguien omito en la siguiente relación que sepa que es sólo en el papel porque siempre tendrá mi agradecimiento por su colaboración en esta obra ya que sin él/ella esto no hubiera salido adelante.

En primer lugar a mi jefe, Juan José Lucena y familia (Paqui, Silvia y Laura) por presentarme a sus "criaturas", los quelatos, y darme la oportunidad de ocupar un pequeño puesto en este fascinante mundo. Gracias por vuestra amistad.

A todas las empresas que me han proporcionado productos para hacer mejorar este trabajo. Al M.E.C. y M.C.y T. por concederme la beca con la cual ha sido posible la realización de este trabajo. A Juan de Agrofit por esas clases magistrales alrededor de una paella.

A mi Doctora Maria Luisa por abrirme un mundo cuando se me estaba cerrando.

Al personal humano del C-VII, por enseñarme todo lo que habéis podido y por considerarme uno de los vuestros. Gracias a M^a José Sarro, Jesús Peñalosa, Pilar Zornoza, Agustín Gárate, Ramón Carpena, Paco, Rosa, M^a Ángeles y a Mari y Pili por hacernos la vida más limpia, y sobre todo a mi compañera de comienzos y jefa, Elvira quien tanto y tan bien me enseñó a dar mis primeros pasos en la investigación y quién primero me presentó a uno de mis mejores compañeros, el MINTEQA2. Seguro que lo harás igual de bien en tu "nueva" empresa.

A mis compañeros de laboratorio a quienes he visto partir pero que como el buen café han dejado poso; Alicia, Lourdes, mi queridísima amiga Araceli, Luismi, Lorena, Pepa, Javi, Beatriz, Raúl, Anita, Pili, Vanesa, Ana Torreblanca, y sobre todo a Ana Álvarez, mi predecesora, maestra y sobre todo amiga porque aunque estés geográficamente lejos todavía me sigues enseñando.

A mis actuales compañeros de laboratorio por soportarme y ayudarme en éstos últimos tiempos; Irene, Tomás, Susana, Arancha y sobre todo a mi queridísimo Edu por echarme una mano en el fabuloso mundo de las valoraciones y en todo lo que se tercie, te deseo lo mejor en el mundo empresarial. A mis otros compañeros, María Villén, María Prieto y Saúl por nuestros cafés y comidas tan provechosos en donde siempre me habéis demostrado algo más que compañerismo.

A mis amigos, Sonia la "esencia" de los quelatos, gracias por aguantar todos mis malos días siempre con esa sonrisa nacional. A Olga y Ángel por estar siempre ahí, lo se, eso vale mucho. A mi amigo el Dr. Ignacio por todos los años que llevamos juntos, por todas las cafés y comidas silenciosas pero muy cómodas, por todo lo que hemos aprendido juntos, por estar ahí. A Almudena, Alejandro y Paula por hacer tuyas mis preocupaciones.

A Raúl, Elias, Olga, Esteban, Andrés y David aunque estéis lejos, siempre estaremos cerca.

A mi familia in law, Juli y Eva por tratarme como uno más de la familia y hacérmelo sentir de verdad. A Natalio y a la memoria de las abuelas, Juliana y Teodora, por sus justas y sabias palabras. A Natalia y Jesús por vuestra continua preocupación por mí y por vuestra inestimable ayuda siempre que la he necesitado. A Natalia y José Luis por esos domingos de charla, por todo el cariño que siempre habéis demostrado hacia mí y sobre todo por confiarme la mejor obra que nunca habéis realizado ni realizareis.

A mi familia paterna, mis tíos Primitivo y Conchita y mis primos Susana, Olga, Germán y Jorge con quienes la distancia nunca ha sido tal en los momentos verdaderos. A mi tía Carmen por ejercer de abuela y por toda la tranquilidad que me ha aportado el saber que está ahí. A mi otra "abuela", Josefa por adoptarme. A Bautista por ser como es y por todas las charlas tan agradables que siempre está dispuesto a tener conmigo, espero seguir teniéndolas. A la memoria de mis abuelos paternos porque seguro que estarían orgullosos de su nieto.

A mi familia materna, a mis tíos y primos de Manzanal del Barco por hacerme la infancia tan feliz y sobre todo a ti, Pipe. A la memoria de mis abuelos maternos porque seguro que me perdí mucho. A mi tía Eloisa por estar siempre ahí ejerciendo de madre, por cierto muy bien. A mis primos Yolanda, Ciro, José María, Rafael y Mónica por ser mis otros hermanos, y como tales por toda su confianza y cariño que siempre han demostrado hacia mí y hacia lo que me importa.

A mi hermano, Mariano y M^a Paz (y a mis sobrinos María y ...) por todo lo que me quieren y porque siempre han entendido todo lo que he hecho y me han apoyado.

A mi padre que aunque se fuera pronto sus ansias de aprender me han movido durante todo este tiempo. Muchas gracias por enseñarme a pensar.

A mi madre; por todo, por como es, por su continuo e incondicional apoyo, por su confianza, por su entrega, por su amor hacia sus hijos.

Y por supuesto, a Marisa, por su amistad, comprensión y apoyo demostrado en cada gesto, acción y momento. Por entender esto sin pedir más que una sonrisa, por su generosidad. Por valorarme sin buscar un punto final. Por estar ahí. Y por todo lo demás...sí y siempre.

Parte de este trabajo ha dado lugar a las siguientes publicaciones en revistas de investigación:

1. Gómez-Gallego, M, Sierra, M. A.; Alcázar R.; Ramírez, P; Piñar, C.; Mancheño, M. J.; García-Marco, S.; Yunta, F. And Lucena, J. J. (2002). Synthesis of *o,p*-EDDHA and its detection as the main impurity in *o,o*-EDDHA commercial iron chelates. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6395-6399.
2. Yunta, F.; Sierra, Sierra, M. A.; Gómez-Gallego, M.; Alcázar, R; García-Marco, S. and Lucena, J. J. (2003) Methodology to screen new iron chelates. prediction of their behaviour in nutrient solution and soil conditions. *J. Plant Nutr.* (aceptado).
3. Yunta, F.; García-Marco S.; Lucena J.J. (2003). Theoretical Speciation of Ethylenediamine-N(*o*-hydroxyphenylacetic)-N'(*p*-hydroxyphenylacetic) acid (*o,p*-EDDHA) in Agronomic Conditions. (2003) *J. Agric. Food Chem.* (aceptado)
4. Yunta, F.; García-Marco, S.; Lucena, J.J.; Gómez-Gallego, M.; Roberto Alcázar, R.; and Sierra, M. A. (2003). Chelating Agents Related to Ethylenediamine bis(2-hydroxyphenyl)acetic acid (EDDHA): Synthesis, Characterization and Equilibrium Studies of the Free Ligands and their Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+} Chelates. *Inorg. Chem.* (aceptado)
5. Yunta, F.; García-Marco, S.; Lucena, J.J.; Gómez-Gallego, M.; Roberto Alcázar, R.; and Sierra, M. A. (2003). Chelating agents related to di(2-hydroxyphenyl)aminoacetic acids: Synthesis, Characterization and Equilibrium studies of the Free Ligands and their Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+} Chelates. *Inorg. Chem.* (en revision).

Y actualmente se está tramitando la patente

6. Sierra, M. A.; Gómez-Gallego, M.; Alcázar-Romero, R.; Lucena J. J.; Álvarez-Fernández, A.; Yunta-Mezquita, F. (2002). Nuevo procedimiento para la preparación de ácidos bis(2-hidroxiaril)aminoacéticos utilizando agentes de transferencia de cianuro. WO/ 02/00604.

ÍNDICE GENERAL

	pág
1. Introducción	1
2. Objetivos	29
3. Methodology to screen new iron chelates. Prediction of their behaviour in nutrient solution and soil conditions	35
4. Chelating Agents Related to Ethylenediamine bis(2-hydroxyphenyl)acetic acid (EDDHA): Synthesis, Characterization and Equilibrium Studies of the Free Ligands and their Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+} Chelates	51
5. Chelating agents related to bis(2-hydroxyphenyl)aminoacetic acids: Synthesis, Characterization and Equilibrium studies of the Free Ligands and their Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+} Chelates	99
6. Theoretical Speciation of Ethylenediamine-N(o-hydroxyphenylacetic)-N'(p-hydroxyphenylacetic) acid (o,p-EDDHA) in Agronomic Conditions	129
7. Modelización de los quelatos férricos en condiciones agronómicas	159
8. Discusión general	181
9. Conclusiones	211
10. Bibliografía	217
11. Anexos	237

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1.	Clorosis férrica	5
1.1.1.	Corrección de la clorosis férrica	6
1.2.	Quelatos férricos sintéticos	7
1.2.1.	Legislación española y de la CE	7
1.2.1.1.	Legislación en vigencia	7
1.2.1.2.	Revisión de la legislación actual	8
1.2.2.	Análisis de mercado	9
1.3.	Agentes quelantes	11
1.3.1.	Síntesis de los agentes quelantes	11
1.3.2.	Estructura de los agentes quelantes	15
1.3.2.1.	Estructura general	15
1.3.2.2.	Isomería óptica y geométrica	18
1.4.	Métodos de análisis de quelatos férricos	21
1.4.1.	Métodos colorimétricos	21
1.4.2.	Métodos cromatográficos	21
1.4.3.	Método espectroscópicos	22

1. Introducción

1.5.	Caracterización del quelato férrico	23
1.5.1.	Constantes de formación	23
1.5.2.	pM ^{nt} y Especiación	24
	1.5.2.1. Modelos de especiación química	25
1.5.3.	Estabilidad del quelato férrico	26

1.1. Clorosis férrica

La clorosis férrica es una alteración nutricional que provoca la disminución del rendimiento de cultivos sensibles que crecen en suelos calizos o alcalinos. El bajo aporte de Fe a la planta hace que disminuya la producción de fotosintatos necesarios para el crecimiento y desarrollo de la misma, implicando una merma de la producción (Miller et al., 1984). En España se estima que el gasto en tratamientos de hierro alcanza cada año cifras muy superiores a 45 millones de euros (Hernández-Apaolaza et al., 1997), sólo en la cuenca del Ebro se ha estimado en 12 millones de euros por año el gasto que suponen los tratamientos correctores de la clorosis férrica (Sanz et al. 1992).

La clorosis férrica se manifiesta por el amarilleamiento de las zonas intervenales de las hojas jóvenes, mientras que los nervios permanecen verdes (Chaney, 1984). En casos extremos, la hoja adquiere un color blanco pudiendo llegar a manifestar necrosis. El hecho de que los síntomas de la deficiencia de Fe aparezcan primero en las hojas jóvenes se debe a la relativa inmovilidad del elemento en el interior de la planta (Marschner, 1995).

Las causas de la clorosis férrica son múltiples y de distinta naturaleza. Álvarez-Fernández (2000) y Sánchez-Sánchez (2002) hacen una revisión extensa de dichas causas, entre las que destacan;

- Bajo nivel de hierro en disolución: aunque el hierro es el cuarto elemento más abundante de la litosfera (después del oxígeno, silicio y aluminio), su baja concentración en la disolución de suelos calizos (pHs 7,5-8,5) hace que esté poco disponible para las plantas (Lindsay, (1979).
- Presencia del ión bicarbonato que afecta tanto a la disponibilidad de Fe (Yang et al., 1994) como al transporte (Alhendawi et al., 1997) y utilización por la planta (Romera et al., 1992; Mengel, 2001)
- Interacciones de Fe con otros elementos como: macronutrientes (Ca, Mg, NO_3^- , P) (Norvell, 1991; Lucena, 2000; Juárez et al., 1996) micronutrientes (Mn, Cu, Zn, Ni) (Lindsay, 1984), elementos beneficiosos (Co) (O'nan et al. 1997) y metales pesados (Cu, Zn, Cd y Pb) (Alcántar et al. 1994).

1. Introducción

- Aporte de materia orgánica a suelos inundados provocando un aumento de los niveles de bicarbonato en la rizosfera (Loeppert et al., 1994)
- Factores ambientales como humedad (Weil et al., 1997), salinidad (Nabhan et al., 1977), temperaturas frías (Chaney, 1984), inducción por herbicidas (Udoh and Nelson, 1983), etc.

1.1.1. Corrección de la clorosis férrica

Las diferentes técnicas de prevención y tratamiento de la clorosis férrica se pueden dividir en las categorías recogidas en la figura 1.1. (Chen, 1997; Lucena, 2003)

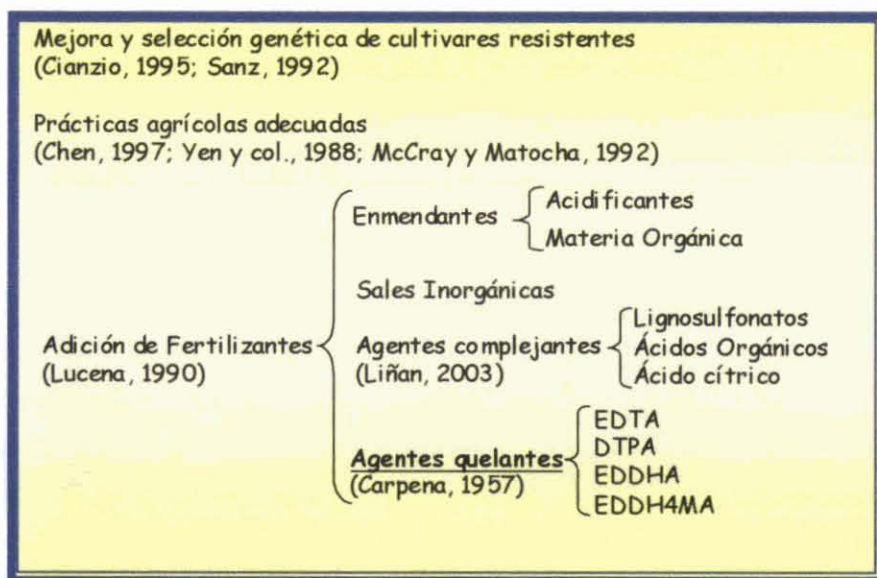


Figura 1.1. Métodos de corrección de la clorosis férrica

En cuanto a los quelatos sintéticos, objetivo principal del presente trabajo, su aplicación en España comenzó en los años 50 (Carpena, 1957). El agente quelante de uso más difundido para la obtención de quelatos de Fe es el EDTA. Sin embargo, en el caso concreto del EDTA/Fe³⁺, sólo es estable en condiciones ácidas, por lo que fue necesario diseñar nuevos quelatos de hierro con diferentes ligandos que permitieran su uso en condiciones neutras o alcalinas, por lo general se trata de ácidos poliaminocarboxílicos (figura 1.1.).

Los quelatos metálicos consisten en aniones orgánicos complejos, llamados en este caso agentes quelantes, con dos o más grupos funcionales que son capaces de compartir pares de electrones con un ión metálico localizado centralmente, formándose una estructura cíclica, en la que el metal queda retenido de forma que se impide su precipitación (Lehman, 1963). La formación de quelatos con metales proporciona a éstos un incremento en la solubilidad, favoreciendo su transporte hacia las raíces de las plantas. Por lo tanto, en agricultura se utilizan los quelatos como fertilizantes de micronutrientes, tales como Fe, Mn, Cu y Zn, entre otros.

Brown (1969) resume las características que debe tener un quelato para que su uso con fines agrícolas sea viable; a) el metal (Fe, Mn, Cu o Zn) no debe ser sustituido fácilmente por otro metal en el anillo; b) debe ser estable frente a la hidrólisis; c) no debe descomponerse por microorganismos del suelo; d) debe ser soluble en agua; e) no debe fijarse fácilmente en la superficie de las partículas del suelo; f) debe estar en forma accesible a la planta (excepto los quelatos de Fe^{3+} los cuales las plantas de la Estrategia I los va a reducir a Fe^{2+} para su absorción); g) no debe ser tóxico en dosis adecuadas; h) debe estar en forma fácilmente aplicable al suelo o a la planta; i) debe ser barato.

1.2. Quelatos férricos sintéticos

1.2.1. Legislación española y de la CE

1.2.1.1. Legislación en vigencia

La normativa vigente referida a estos productos es la orden ministerial del 28 de mayo de 1998 (B.O.E. 2 de julio de 1998), que traspone la directiva de la CE 98/3/CE (D.O.C.E. L.18 del 23/1/98). Por esta orden los productos que se declaren como quelatos de Fe deben ser productos solubles en agua obtenidos por combinación química de hierro con un agente quelante, han de presentar un mínimo de un 5% de Fe soluble en agua y al menos 8/10 partes del contenido declarado debe estar en forma quelada (por tanto el mínimo absoluto es un 4% de Fe quelado), y ha de especificarse el tipo de agente quelante de entre la lista de los autorizados que son ácidos o sales de sodio, potasio o amonio de los siguientes compuestos:

1. Introducción

Ácido etilendiamino-di-(<i>o</i> -hidroxifenilacético)	EDDHA	$C_{18}H_{20}O_6N_2$
Ácido etilendiaminotetraacético	EDTA	$C_{10}H_{16}O_8N_2$
Ácido dietilentriaminopentaacético	DTPA	$C_{14}H_{23}O_{10}N_3$
Ácido 2-hidroxi-etil-etilendiaminotriacético	HEDTA	$C_{10}H_{18}O_7N_2$
Ácido etilendiamino-di-(<i>o</i> -hidroxi-4-metilfenilacético)	EDDH4MA	$C_{20}H_{24}O_6N_2$
Ácido etilendiamino-di-(5-carboxi-2-hidroxifenilacético)	EDDCHA	$C_{20}H_{20}O_{10}N_2$

Gracias a esta orden se regula también la comercialización de productos obtenidos por disolución de los quelatos de Fe en agua, bien solos o mezclados con sales de hierro. Para estos productos se establece como mínimo contenido en Fe, un 2% de Fe soluble en agua y se ha de especificar tanto el tipo de agente quelante como el anión o aniones inorgánicos, si procediese.

1.2.1.2 Revisión de la legislación

Álvarez-Fernández (2000, 2001, 2002) realizó un control de calidad del mercado español de correctores de carencias de hierro simples hasta el año 1999. La naturaleza de los quelatos férricos sintéticos de EDDHA/Fe³⁺ y de EDDH4MA/Fe³⁺ comercializados en España hasta 1998 difiere de la información técnica suministrada en la etiqueta y no cumple con la normativa vigente. En la mayoría de los casos estas diferencias afectan al agente quelante. Así era frecuente encontrar EDDHSA (ácido etilendiamino-di-(*o*-hidroxi-5-sulfonilfenilacético) en lugar de EDDHA, o EDDH5MA (ácido etilendiamino di-(*o*-hidroxi-5-metilfenilacético) en lugar de EDDH4MA. Además, las formulaciones de EDDHA/Fe³⁺ presentan *o,p*-EDDHA/Fe³⁺ (ácido etilendiamino N-(*o*-hidroxifenilacético)-N'-(*p*-hidroxifenilacético) y un producto de descomposición de la molécula de *p,p*-EDDHA (ácido etilendiamino di(*p*-hidroxifenilacético)). Las formulaciones de EDDH4MA/Fe³⁺ contienen otros agentes quelantes derivados de la síntesis (EDDH6MA (ácido etilendiamino-di(2-hidroxi-6-metilfenilacético) y EDDH4,6MA (ácido etilendiamino-di(2-hidroxi-4,6-dimetilfenilacético)).

Gracias a este control de calidad, la riqueza en hierro quelado ha pasado del 0,5 - 3,5% en el año 1999 al 3-5,4% de hierro quelado en el año 2002 (Lucena, 2002).

La actual legislación está en proceso de revisión con el fin de incluir los agentes quelantes que han ido apareciendo o bien como producto principal de síntesis (EDDHSA) o bien como productos secundarios (*o,p*-EDDHA), y los diferentes isómeros posicionales derivados de la sustitución, en diferentes posiciones, del grupo metilo en el anillo bencénico; EDDH5MA, EDDH6MA y EDDH4,6MA). Esto exige de estudios que evalúen la capacidad como fertilizante férrico de estos nuevos agentes quelantes en comparación a los compuestos habituales.

1.2.2 Análisis de mercado

Utilizando los datos de Álvarez-Fernández (2000) y del Vademécum de productos sanitarios y nutricionales del presente año (Liñan, 2003) se realiza un análisis de la evolución del mercado nacional de productos destinados a la corrección y prevención de deficiencia de Fe en cuya composición se encuentra el Fe en forma de quelato sintético. El número de productos con agentes quelantes sintéticos se ha cuadruplicado desde el año 1990 (56) hasta el año 2003 (222). La figura 1.2. muestra la proporción de cada uno de ellos con respecto al total de agentes quelantes sintéticos. El EDDHA es el agente quelante sintético más utilizado en las formulaciones. Aunque el número de formulaciones con EDDHA ha aumentado, el porcentaje con respecto al año 1990 ha disminuido, 76% en 1990 frente a un 67% en el presente año. Es importante reseñar el aumento de formulaciones con EDDHSA como agente quelante, 1 en 1998 frente a las 14 declaradas en el 2003, teniendo en cuenta que dicho agente quelante todavía no está incluido en la vigente legislación como agente quelante.

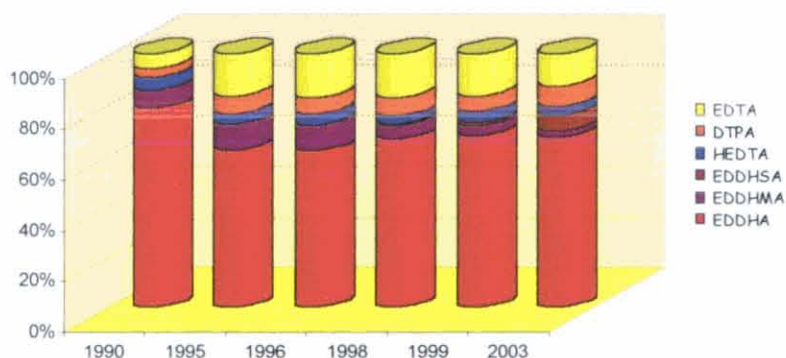


Figura 1.2. Distribución del mercado de quelatos férricos sintéticos en función del tipo de agente quelante en distintos años. (Álvarez-Fernández, 2000 y Liñan, 2003)

Si nos centramos en la presente campaña, la figura 1.3. muestra la distribución de los productos que se utilizan como correctores de carencia de hierro simples comercializados en España en el 2003 así como la distribución de los agentes quelantes sintéticos. De los 287 productos comerciales, 222 contienen un agente quelante sintético como principio activo. De estos 222 productos con agente quelante sintético, los que contienen EDDHA siguen siendo los más abundantes (149 formulaciones). Si se diferencia entre los agente quelantes sintético fenólicos (EDDHA, EDDHMA y EDDHSA) y los no fenólicos (EDTA y análogos) aquellos cubren el 76% del mercado con lo que siguen siendo los más demandados.

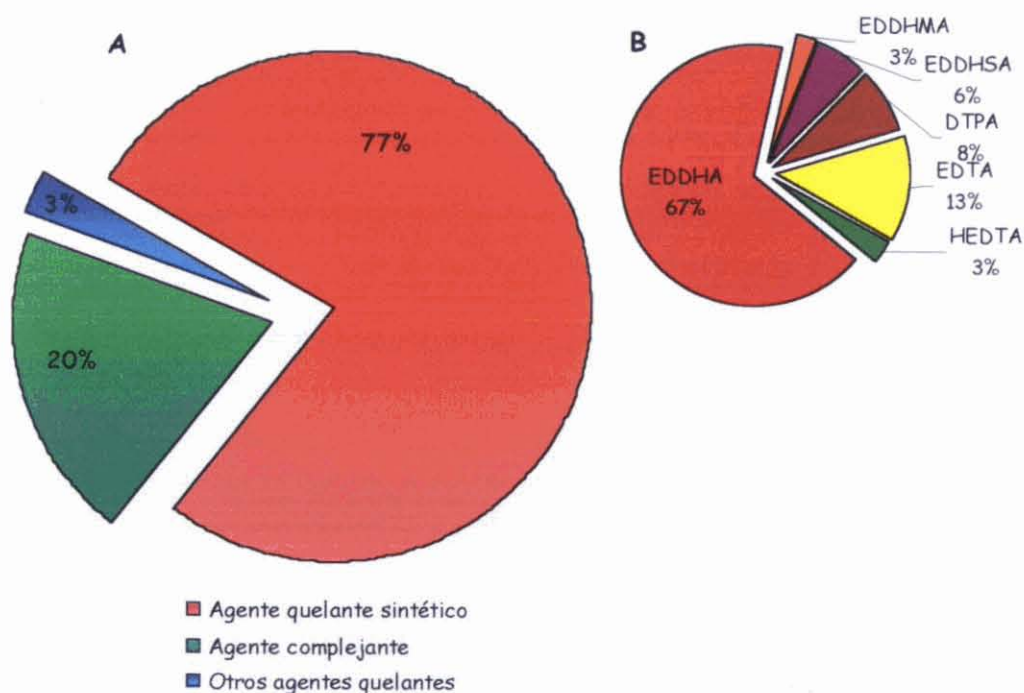


Figura 1.3. A) Distribución de los productos simples para corregir la clorosis férrica. B) Distribución de los quelatos férricos sintéticos en función del agente quelante. (De Liñan, 2003).

De todo lo anterior se puede deducir la gran importancia de los productos conteniendo agentes quelantes sintéticos fenólicos dentro del mercado de los correctores de carencias de hierro simples. Sierra et al (2002) y Gómez-Gallego et al. (2002) han propuesto métodos de síntesis novedosos que podrían significar la inclusión de

nuevos productos en el mercado. Además, y viendo la utilización de agentes quelantes que no están reconocidos en la vigente legislación (EDDHSA) o los nuevos productos (*o,p*-EDDHA), sería oportuno realizar una caracterización tanto de estos agentes quelantes como otros posibles de nueva síntesis con el fin de estudiar su capacidad como correctores de la clorosis férrica incluso antes de su aplicación sobre los cultivos.

1.3. Agentes quelantes

1.3.1 Síntesis de los agentes quelantes

El EDDHA se sintetiza por primera vez por Kroll en 1957, utilizando un proceso de síntesis muy común en la preparación de α -aminoácidos que se conoce como "Síntesis de Strecker" (figura 1.4.). Knell y Kroll (1961) patentan esta síntesis tanto del EDDHA como de muchas moléculas homólogas, entre las cuales se encuentran el EDDHMA, EDDHSA y EDDCHA. Esta ruta de síntesis está limitada por la reactividad de la base de Schiff formada en la primera reacción (Frost y Freedman, 1959; Wilson, 1987). Hoy en día la síntesis de Kroll et al. (1957) a pesar de ser la más eficaz desde el punto de vista químico, ya que produce el compuesto con elevada pureza, no se utiliza debida a que requiere el manejo de HCN líquido.

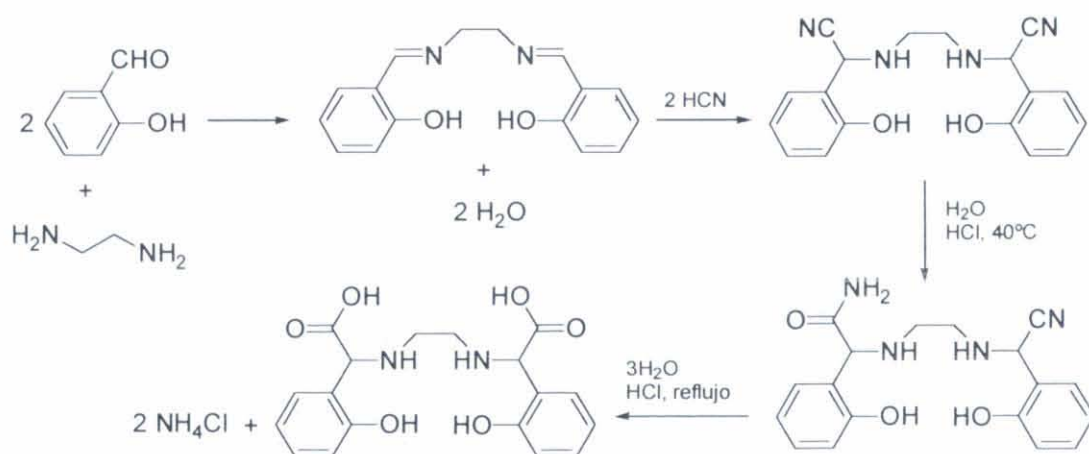


Figura 1.4. Primera síntesis del EDDHA y sus compuestos homólogos (Kroll et al., 1957).

Dexter (1958) propone otra ruta para la obtención de EDDHA que consiste en una única reacción. Se trata de una reacción tipo Mannich entre fenol, glioxilato sódico y etilendiamina (figura 1.5.). Este método es el que se utiliza actualmente en el mercado para la preparación del EDDHA y todos sus derivados.

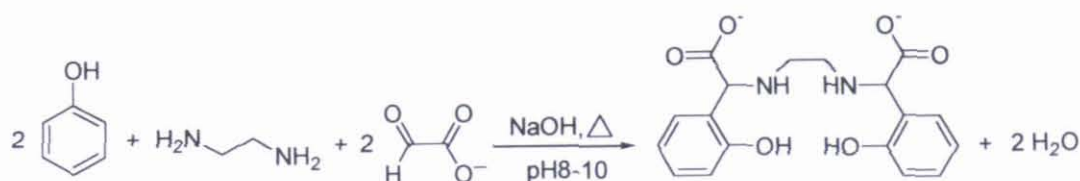


Figura 1.5. Síntesis del EDDHA Dexter (1958).

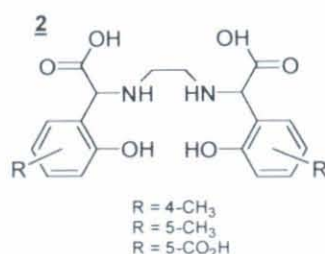
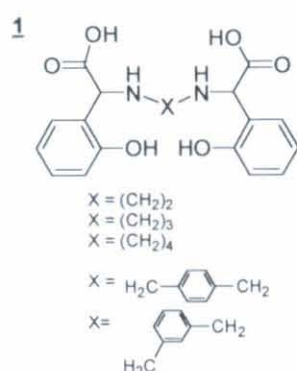
Esta ruta de síntesis tiene como ventaja respecto a la de Kroll et al. (1957) que el número de manipulaciones que hay que hacer para obtener el EDDHA es menor y además no se utiliza el HCN. Sin embargo presenta el inconveniente de no producir un compuesto puro, ya que da lugar a diferentes isómeros posicionales, en función de qué posición del anillo fenólico reaccione con el ion diimonio, y a productos de policondensación (Álvarez-Fernández et al., 2002). Si se supone que la reacción de un lado de la molécula del ion diimonio es dependiente de la del otro lado, para formar así una molécula simétrica, esta síntesis producirá dos isómeros posicionales el *o,o*-EDDHA (ácido etilendiamino-di-(*o*-hidroxifenilacético)) y el *p,p*-EDDHA (ácido etilendiamino-di-(*p*-hidroxifenilacético)) (Petree et al., 1978). Sin embargo, Dawson y Warne (1992), Hernández-Apaolaza et al. (1997) y más recientemente Cremonini et al. (2001) detectan la presencia de un isómero posicional más como resultado de dicha síntesis, es decir, se formarían tres isómeros posicionales, los dos ya citados *o,o*-EDDHA y *p,p*-EDDHA, y el *o,p*-EDDHA (ácido etilendiamino-N-(*o*-hidroxifenilacético)-N'-(*p*-hidroxifenilacético). La presencia de dicho compuesto ha sido detectada por Cremonini et al. (2001) y demostrada sin ambigüedad por Gómez-Gallego et al. (2002). Dexter (1958) y Petree et al., (1978) probaron diferentes condiciones para dirigir la sustitución sobre el fenol hacia la posición *orto* en la síntesis.

Además, y con el fin de obtener agentes quelantes puros capaces de formar quelatos de hierro de alta estabilidad, Dexter (1958) utiliza como compuesto de partida productos derivados del fenol en los que la posición *para* del fenol está ocupada, impidiendo de esta forma la sustitución en *para*. Así, utilizando *p*-hidroxibencenosulfónico

y el ácido *p*-hidroxibenzoico se obtienen los agentes quelantes EDDHSA y EDDHCA respectivamente sin mezcla de isómeros posicionales. Sin embargo, cuando se utiliza *m*-cresol o *p*-cresol, el EDDHMA que se obtiene será una mezcla de isómeros posicionales del metilo.

De forma menos generalizada, Hoefnagel y van Bekkum (1994) proponen un procedimiento para obtener *o,o*-EDDHA y *p,p*-EDDHA mediante una separación intermedia de los isómeros de ácido *orto*- y *para*-hidroximandélico respectivamente.

Sierra et al. (2002) han desarrollado un nuevo procedimiento para la síntesis de,



entre otros, bis(2-hidroxifenil)aminoacéticos (**1**), que presentan los grupos aminos unidos por cadenas hidrocarbonadas de diferente longitud y estructura, y de ácidos etilendiamino-di(2-hidroxifenil)acéticos (**2**) distintamente sustituidos en el

anillo aromático.

El procedimiento (figura 1.6.), consiste en la formación de bis- α -aminonitrilos por reacción de las correspondientes diiminas con cianuro de trimetisililo (TMSCN) u otro reactivo equivalentes no generador de HCN en el medio, seguido de hidrólisis ácida del nitrilo para conducir a los ligandos anteriormente mencionados. Una vez se tiene los bis- α -aminonitrilos se puede emplear una ruta alternativa para obtener otros ligandos de sumo interés con el fin de demostrar que la capacidad del EDDHA para quelar Fe de forma estable a pH superiores de 6 es debida a la presencia del grupo hidroxilo unido al anillo de benceno en *orto* respecto de la cadena aminocarboxílica. Así, y para evitar productos de retrocondensación, se realiza una hidrólisis de los nitrilos mediante una formilación previa de los grupos amino en los nitrilos ($\text{HCOOH}/\text{Ac}_2\text{O}$) seguido por la hidrólisis ácida con HCl concentrado (Vachal et al. 2000 y Sigman et al. 2000). De esta forma se obtienen el *p,p*-EDDHA y el ácido etilendiamino-di(2-metoxifenilacético), (EDDMtxA).

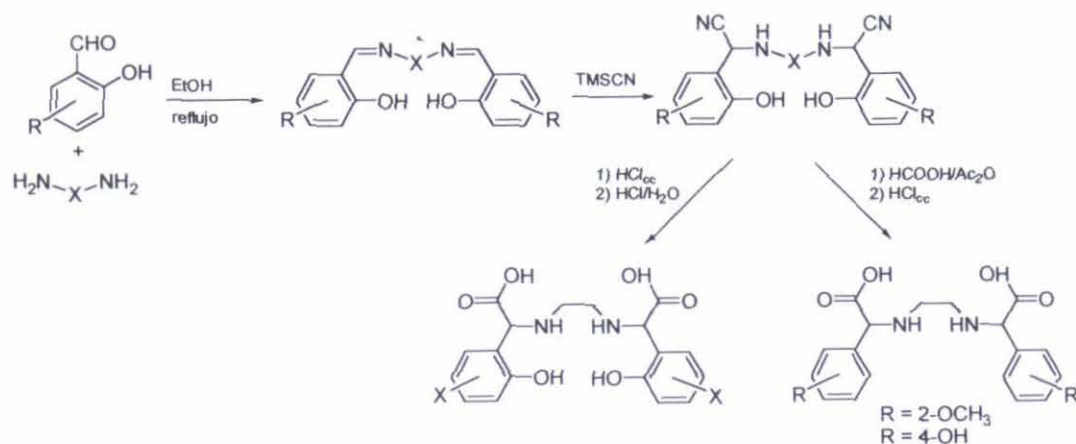


Figura 1.6. Síntesis de Sierra et al. (2002).

De la misma forma, como se ha mencionado anteriormente, variando las diaminas y el salicilaldehído de partida se pueden obtener agentes quelantes análogos al EDDHA. Así, si se utiliza salicilaldehído con derivados de la etilendiamina se obtienen agentes quelantes con los grupos aminos unidos por cadenas hidrocarbonadas de diferente longitud y estructura. Partiendo de etilendiamina se obtiene el EDDHA, de propilendiamina se obtiene el ácido propilendiamino-di(2-hidroxifenilacético) (PDDHA); de butilendiamina, el ácido butilendiamino-di(2-hidroxifenilacético) (BDDHA) y de *p*-xililendiamina, el ácido *p*-xililendiamino-di(2-hidroxifenilacético) (*p*-XDDHA). Si se utilizan derivados de salicilaldehído con etilendiamina se obtienen agentes quelantes análogos al EDDHA pero con diferentes sustituyentes en el anillo de benceno. Si se utiliza 5-metilsalicilaldehído se obtiene el ácido etilendiamino-di(2-hidroxi-5-metilfenilacético), (EDDH5MA), agente quelante presente en algunas formulaciones comerciales y si se utiliza el 4-metilsalicilaldehído se obtiene el ácido etilendiamino-di(2-hidroxi-4-metilfenilacético) (EDDH4MA), agente quelante permitido recogido en la legislación actual. Por otra parte, y a diferencia de los métodos más utilizados en la actualidad para la preparación de ligandos comerciales, el procedimiento que se describe en esta invención permite obtener ligandos isomérica y químicamente puros, con distinto tipo y grado de sustitución en los anillos bencénicos y con cadenas espaciadoras entre los átomos de nitrógeno, de diferente longitud y estructura.

Gómez-Gallego et al. (2002) desarrollaron dos rutas alternativas para la síntesis de *o,p*-EDDHA, tercer isómero posicional que aparece en la síntesis del EDDHA según

Dexter (1958), y de cualquier otro agente quelante con estructura asimétrica. La primera ruta utiliza arilglicinatos y glioxal como materiales de partida (figura 1.7.); la segunda ruta está basada en la reacción de Strecker utilizando benzaldehidos sustituidos y etilendiamina como materiales de partida (figura 1.8.).

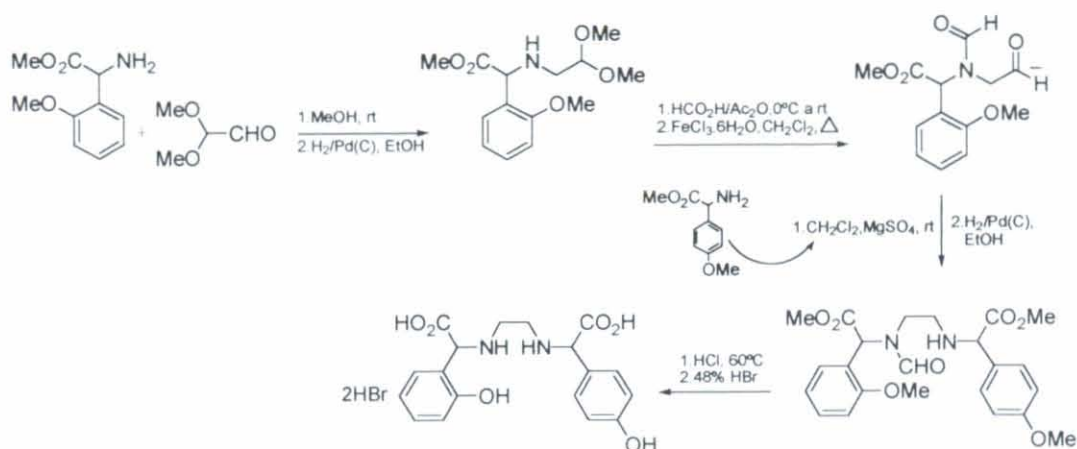


Figura 1.7. Ruta de síntesis del *o,p*-EDDHA partiendo de arilglicinatos y glioxal.

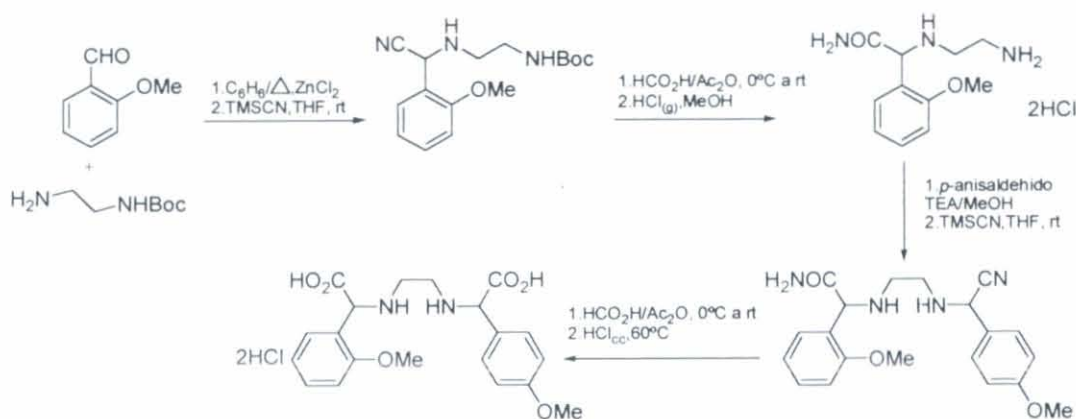


Figura 1.8. Ruta de síntesis de *o,p*-EDDHA partiendo de benzaldehidos sustituidos y etilendiamina.

1.3.2. Estructura de los agentes quelantes

1.3.2.1. Estructura General

1. Introducción

Como ya se ha indicado en el análisis de mercado del año 2003 (apartado 1.2.2.), el agente quelante más común en el mercado español de los quelatos férricos sintéticos es el EDDHA, debido su alta eficacia en condiciones de campo. La estructura genérica del EDDHA así como de sus análogos sintetizados por Dexter (1958) (EDDHSA), Sierra et al. (2002) (PDDHA, BDDHA, *p*-XDDHA, EDDH4MA, EDDH5MA, *p,p*-EDDHA y EDDMtxA) y Gómez-Gallego et al. (2002) (*o,p*-EDDHA) puede verse en la figura 1.9.

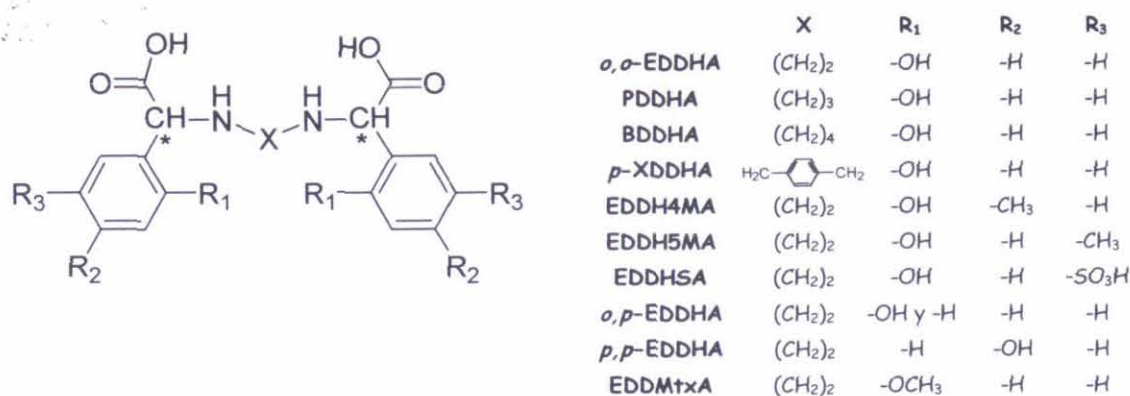


Figura 1.9. Estructura genérica de los agentes quelantes análogos a EDDHA. *Carbonos quirales

La estructura del *o,o*-EDDHA presenta seis grupos funcionales donadores de electrones; dos ácidos carboxílicos, dos aminas secundarias y dos fenoles. La fuerza de la coordinación de los grupos donadores se relaciona con la acidez del metal y con la basicidad del protón del oxígeno y del nitrógeno donador. La mayor selectividad del ligando por metales más ácidos (como por ejemplo, Fe³⁺ y Al³⁺) sobre metales menos ácidos (como por ejemplo, Cu²⁺ y Zn²⁺) incrementará cuando incrementa el número y basicidad de los grupos de oxígenos cargados (Hancock y Martell, 1989). Así si se comparan las estructuras del *o,o*-EDDHA con la del EDTA (agente quelante análogo al *o,o*-EDDHA con seis grupos funcionales donadores de electrones; cuatro ácidos carboxílicos y dos aminas terciarias e incluido en la actual legislación) la sustitución de dos oxígenos carboxílicos por dos oxígenos fenólicos, mucho más básicos, (más concretamente la presencia en la molécula del grupo fenolato con el hidroxilo en *orto* respecto de la cadena de carácter aminocarboxílico) confiere a los productos de *o,o*-EDDHA/Fe³⁺ una eficacia para mantener Fe³⁺ en disolución en suelos calizos, muy superior al resto de agentes

quelantes derivados de los ácidos poliaminocarboxílicos como el EDTA, DTPA o HEDTA que no presentan en su estructura el grupo fenolato (Lindsay, 1979).

La presencia de nitrógenos donadores lleva a una mayor selectividad para metales que tienen una alta afinidad por nitrógeno (como por ejemplo, In^{3+} , Ga^{3+} o Fe^{3+}) (Hancock y Martell, 1989). Además de la selectividad debida a los grupos funcionales, otros factores particulares de los agentes quelantes afectan sobre su estabilidad. El "efecto quelato", definido por el tamaño del ión metálico y por el número de átomos que forman el anillo entre el metal y el agente quelante, resulta de gran importancia para controlar la estabilidad del complejo y la selectividad. Así, Hancock et al. (1985, 1986, 1989) apuntaron, mediante el uso de cálculos de mecanismos moleculares, que el tamaño del metal está relacionado con su preferencia por la formación de anillos, entre el agente quelante y el metal, de cinco o seis miembros. Complejos con metales grandes sufren un mayor grado de desestabilización, mediante un incremento en el tamaño del anillo, que los correspondientes complejos con metales pequeños. Esta observación satisface el hecho de que TMDTA (ácido trimetilendiaminotetraacético) forme quelatos menos estables que el EDTA con átomos grandes (por ejemplo con Cd^{2+} y con La^{2+}) mientras que el quelato TMDTA/ Cu^{2+} es más estable que el correspondiente con EDTA (Hancock, 1988). TMDTA contiene un puente de trimetilendiamina mientras que EDTA tiene un puente de etilendiamina. Basolo y Johnson (1964) postularon que los anillos de cinco miembros forman quelatos más estables que los anillos de seis miembros, sino contienen dobles enlaces. Otro factor muy importante a la hora de estudiar la afinidad de un metal hacia la formación de un quelato estable es la disposición espacial adecuada. Lucena et al. (1996) vieron que la orientación estérica más favorable era la causa de que el HBED/ Fe^{3+} (ácido etilendiamino $\text{N,N}'$ -(*o*-hidroxifenil)- $\text{N,N}'$ -(diacético)) fuera más estable que el EDDHA/ Fe^{3+} o el EDDH4MA/ Fe^{3+} , aunque ambos agentes quelantes tengan los mismos grupos funcionales. De igual forma estos autores vieron que el aumento de tamaño del anillo del quelato de cinco miembros (HBED) a seis miembros (HPED; ácido etilendiamino $\text{N,N}'$ -(*o*-hidroxifenil)- $\text{N,N}'$ -(dipropiónico)) producía un descenso en las constantes de estabilidad del quelato férrico formado de 10^{39} a 10^{31} respectivamente (Ma and Martell, 1991). Bannochie and Martell (1981) también explican utilizando la orientación estérica cómo el *rac*-EDDHA forma un quelato férrico más estable que el *meso*-EDDHA.

Por lo tanto, a la hora de diseñar un agente quelante con gran especificidad hacia un ión metálico es necesario tener en cuenta los factores que dependan del agente quelante; naturaleza y número de grupos funcionales, número de miembros que forman el anillo resultante de la unión del metal y el agente quelante; y del ión metálico; la estructura electrónica del ión metálico, su tamaño, estado de oxidación, número de coordinación, estereoquímica, la naturaleza del enlace entre el metal y el ligando.

1.3.2.2. Isomería óptica y geométrica

El EDDHA y sus compuestos homólogos descritos en las síntesis de Sierra et al. 2002 y de Gómez-Gallego et al. 2002 poseen dos formas isoméricas (isomería óptica). El EDDHA y los compuestos homólogos recientemente citados poseen dos formas isoméricas (isomería óptica). Dado que la molécula de EDDHA posee cuatro átomos quirales, dos átomos de carbono y dos átomos de nitrógeno, podrían resultar un total de 2^4 conformaciones de la quiralidad de estos cuatro átomos. Según Lin y col. (1994), la restricción del enlace $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ a una conformación sesgada (*gauche*) impone una disposición de los dos átomos de nitrógeno quirales entre sí: ambos nitrógenos tienen a la vez configuración R o S. Esta condición elimina también la posibilidad de que se dé simetría especular en la molécula, reduciendo los 16 conformeros a 8. En los cuatro conformeros con los átomos de N en configuración (R,R), los C quirales pueden ser (R,R), (S,S), (R,S) o (S,R). Los (R,S) y (S,R) están relacionados por dos ejes, por lo que son la misma molécula, a la que se denomina isómero meso. Los enantiómeros (R,R) y (S,S) son imágenes especulares, por lo que sólo difieren en la dirección de desviación del plano de la luz polarizada. Dado que la afinidad de las formas (R,R) y (S,S) por los protones y los metales es la misma, ambos no podrían ser separados mediante procesos químicos y generalmente se les denomina mezcla *dl*-racémica (Lucena et al, 1996). Los correspondientes 4 isómeros con los átomos de nitrógeno con configuración (S,S), representan imágenes especulares de los 4 con configuración (R,R).

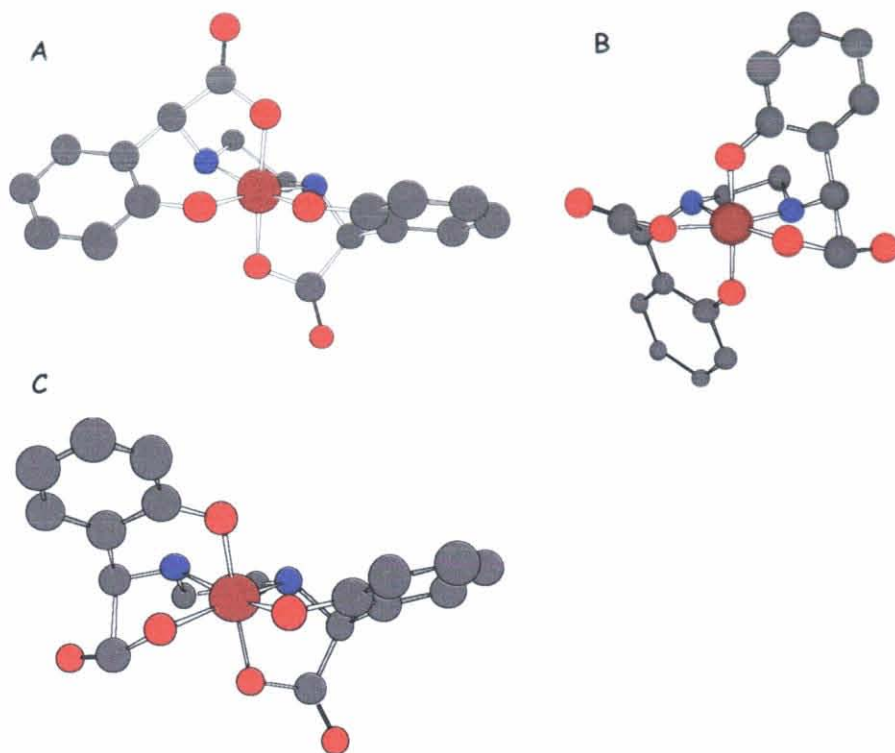


Figura 1.10. Isómeros racémico (A) (R,R)-EDDHA/ Fe^{3+} ; (B) (S,S)-EDDHA/ Fe^{3+} y meso (C) (R,S)-EDDHA/ Fe^{3+} del EDDHA/ Fe^{3+} .

En la figura 1.10. se muestra la estructura química de los isómeros geométricos del complejo férrico formado por el EDDHA. el Fe^{3+} se coordina octaédricamente con el EDDHA que actúa como un ligando hexadentado, obteniéndose un compuesto con estructura de anillo que protege al Fe^{3+} de su precipitación y del ataque de oxidantes. Si realizamos un estudio de la isomería geométrica podemos observar que para el isómero *meso*-EDDHA sólo se produce una disposición espacial, con un grupo fenólico y otro carboxílico en el plano ecuatorial formado por el Fe^{3+} y los dos nitrógenos amínicos (disposición [6,5,5] donde la cifra central indica el número de átomos que forman el anillo entre el metal y los nitrógenos y las otras cifras indican el número de átomos que forman los otros dos anillos ecuatoriales) el otro grupo fenólico y carboxílico se encuentran en el plano axial (C en figura 1.10). Esta disposición debe contener el 50% del EDDHA/ Fe^{3+} . Para los enantiomeros de la mezcla dl-racémica (A y B en figura 1.10), se pueden dar dos disposiciones espaciales diferentes dependiendo de si los grupos funcionales que están en el plano ecuatorial son los dos grupos fenólicos [6,5,6] (estructura más estable según

1. Introducción

Bernauer, 1976) (A en figura 1.10.) o los dos grupos carboxílicos [5,5,5] (estructura que contribuye con menos del 0,5% a la totalidad del 50% de la mezcla dl-racémica) (B en figura 1.10). Bailey et al., 1981 fueron capaces de separar los dos isómeros en cantidades importantes y demostraron cristalográficamente la presencia predominante de la disposición [6,5,6] en la mezcla racémica. Sin embargo Ahrlund et al. (1990) encontraron que para el caso del EDDH4MA/Fe³⁺, el isómero más estable era el *meso*. El mismo resultado obtuvieron Bannochie et al. (1991) cuando separaron los isómeros del agente quelante TMPHPG (ácido trimetilendiamino-di-(2-hidroxi-3,5-dimetilfenilacético)), agente quelante análogo al EDDHA y al EDDH4MA. Esto es debido a que la presencia de grupos metilos en el anillo bencénico favorece más la formación de la forma racémica menos estable [5,6,5].

Además, si se analiza como afecta la prolongación de la cadena carbonada sobre la estabilidad de los isómeros, Bannochie and Martell (1991) demostraron que cuando se añade un grupo metilo en la cadena carbonada que une los grupos amino, la diferencia entre las constantes de estabilidad de los isómeros *rac*-TMPHPG/Fe³⁺ y *meso*-TMPHPG/Fe³⁺ disminuye con respecto a los isómeros del EDDHA/Fe³⁺.

Las diferencias encontradas entre los dos isómeros geométricos de estos quelatos férricos han sido estudiadas tan sólo para el EDDHA/Fe³⁺ y se relaciona fundamentalmente con su comportamiento cromatográfico, cristalográfico y su espectro en el UV-visible (Hill-Cottingham, 1962; Ryskiewich y Boka, 1962; McCreary et al., 1962). La asignación de cada isómero a su respectiva banda la resolvieron Barak y Chen (1987). De esta forma se identifica la banda roja para el isómero dl-racémico-EDDHA/Fe³⁺ y la banda violeta para el isómero *meso*-EDDHA/Fe³⁺. Ahrlund et al., (1990), Deacon et al. (1994) y Hernández-Apaolaza et al. (1997) consiguen separar los isómeros geométricos del EDDH4MA/Fe³⁺ por cromatografía. En general los espectros uv-visible de estos compuestos presentan tres máximos de absorción a 206, 280 y 480 nm que corresponden al anillo de benceno, a la sustitución en *orto*- en dicho anillo (Jaffe y Orchin, 1962) y al enlace Fe-fenolato respectivamente. La absorción en el visible difiere muy poco entre los quelatos EDDHA/Fe³⁺, EDDHMA/Fe³⁺ y EDDCHA/Fe³⁺, así como entre sus correspondientes isómeros geométricos. Por ejemplo, los isómeros geométricos del

EDDHA/ Fe^{3+} presentan una diferencia en el máximo de absorción en el rango visible de 5-10 nm, como ya se había comprobado por el diferente color que mostraban las bandas durante su separación cromatográfica. En el caso de los isómeros geométricos del EDDH4MA/ Fe^{3+} la separación del máximo de absorción en el rango visible es de 8-9 nm.

1.4. Métodos de análisis de quelatos férricos

Para la determinación del Fe-quelado de los quelatos férricos se han propuesto dos tipos de métodos: los colorimétricos y los cromatográficos. Éstos últimos los más utilizados actualmente.

1.4.1 Métodos colorimétricos

Se basan en la medida de la absorción a una determinada longitud de onda de la disolución del quelato férrico bien directamente o después de un tratamiento previo con el fin de eliminar Fe presente en la formulación que no está quelado. Orphanos y Hadjiloucas (1984) proponen un test de laboratorio para quelatos férricos aplicados a suelos calizos. Hjelte y Aminken (1989) comparan la estabilidad de un producto comercial de EDDHMA/ Fe^{3+} con EDDHA/ Fe^{3+} (Sequestrene) mediante un método fotométrico. Lucena et al. (1992^a) desarrollaron un test rápido para evaluar la eficacia de quelatos férricos comerciales, del tipo EDDHA/ Fe^{3+} , EDDH4MA/ Fe^{3+} o similares. Shenker et al. (1992) proponen un nuevo método colorimétrico para la determinación de agentes quelantes mediante la formación del complejo Cu-CAS (cromo-azurol-S), a partir del quelato de cobre y la posterior medida a 582 nm.

Estos métodos presentan el inconveniente de que otros compuestos presentes en la formulación del quelato férrico, pueden absorber a la misma longitud de onda y por tanto los resultados obtenidos no son directamente proporcionales a la riqueza en Fe unido al ligando.

1.4.2. Métodos cromatográficos

1. Introducción

Las separaciones cromatográficas son muy utilizadas para el análisis de quelatos de Fe^{3+} . Se han empleado muy diversas técnicas cromatográficas como son: cromatografía en papel (Hill-Cottingham, 1962), cromatografía en capa fina (Patch, 1983), cromatografía en columna de vidrio preparativa (Boxema, 1979; Bannochie y Martell, 1989) y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). De este último tipo de cromatografía existe gran diversidad de métodos diseñados para el análisis de diversos quelatos férricos de EDTA (Yamaguchi et al., 1983; Venezky y Rudzinski, 1984; Buchberger et al., 1991; Parkes et al., 1981; Vande Gucht, 1994; Deacon et al., 1994; Lucena et al., 1996; Hernández-Apaolaza et al., 1997), DTPA (Vande Gucht, 1994; Deacon et al., 1994; Lucena et al., 1996; Hernández-Apaolaza, 1997), EDDHA (Barak y Chen, 1987; Deacon et al., 1994; Lucena et al., 1996; Hernández-Apaolaza et al., 1997, Hernández-Apaolaza, 2000), EDDHMA (Deacon et al., 1994; Lucena et al., 1996; Hernández-Apaolaza et al., 1997) y EDDHSA (Hernández-Apaolaza, 1997).

Actualmente CEN tiene publicados dos métodos para cuantificar los agentes quelantes utilizados en el mercado utilizando cromatografía iónica. El método EN 13368-2001:1 (2001a) para los agentes quelantes EDTA, HEDTA y DTPA y el método EN 13368-2001:2 (2001b) para los agentes quelantes EDDHA y EDDHMA. García-Marco et al. (2003) realizaron una comparación del método normalizado EN 13368-2001:2 con el método de Lucena et al. (1996) utilizando productos comerciales que contenían EDDH4MA/ Fe^{3+} y EDDHA/ Fe^{3+} . No se observaron diferencias significativas aunque el método de Lucena et al. (1996) era capaz de separar los diferentes isómeros y distinguir entre diferentes isómeros posicionales del EDDH4MA/ Fe^{3+} .

Además existe otro método normalizado que cuantifica el %Fe quelado mediante un método de resina de intercambio catiónico (EN 13366-2001, 2001c). Sin embargo este método no identifica ni cuantifica el agente quelante presente.

1.4.3. Otros métodos espectroscópicos

Hernández-Apaolaza et al. (1997) hipotetizaron, a partir de los cromatogramas obtenidos para EDDHA/ Fe^{3+} , que el EDDHA utilizado para la preparación de quelatos de EDDHA/ Fe^{3+} comerciales podían contener cantidades significativas de los isómeros *p,p*-EDDHA y *o,p*-EDDHA. Sin embargo, esta hipótesis no se pudo confirmar debido a la falta de patrones de estos productos. Cremonini et al. (2000, 2001) utilizaron RMN uni y

dimensional para identificar la presencia de éstos y otros compuestos de descomposición y de condensación. De igual forma Álvarez-Fernández et al. (2002) demostraron, utilizando RMN uni y dimensional, que los quelatos con EDDH4MA/Fe³⁺ contenían isómeros posicionales del EDDH4MA. Este método espectroscópico se utiliza mucho para caracterizar los agentes quelantes de nueva síntesis. Así Gómez-Gallego et al. (2002) caracterizaron el *o,p*-EDDHA mediante las técnicas de ¹H-RMN y ¹³C-RMN.

El inconveniente de esta técnica espectroscópica es que sólo es capaz de cuantificar las impurezas de origen orgánico, sin embargo, en este tipo de agentes quelantes las impurezas de origen inorgánico que se originan durante la síntesis pueden adquirir una gran importancia ya que pueden afectar a la capacidad total de complejación del agente quelante.

1.5. Caracterización del quelato férrico

1.5.1 Constantes de formación

Esta clase de agentes quelantes, además de su uso agrícola (Chen y Barak, 1987), son utilizados en otros campos de la ciencia. En los últimos años se está realizando una investigación intensiva para aplicar estos agentes quelantes o sus análogos con fines médicos (Serratice et al., 2001; Martell et al., 1999; Liu y Haider, 2002a y 2002b). En todos los casos cuando se diseña y sintetiza un producto es necesario conocer su grado de selectividad y de complejación entre el agente quelante y el metal o metales que, de forma mayoritaria, se encuentren en el medio donde se van a aplicar.

Martell y Motekaitis, (1992) resumieron los pasos a seguir para calcular la estabilidad de los agentes quelantes en medio acuoso. Básicamente se trata de utilizar métodos potenciométricos y espectrofotométricos para calcular las constantes de protonación y las constantes de estabilidad entre el agente quelante y los metales. Luego se realiza una especiación química para determinar el comportamiento de esos productos en disolución acuosa.

Frost et al. (1958) fueron los primeros en determinar las constantes de protonación o formación de complejos de Ca²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ y Cd²⁺ con EDDHA. La

1. Introducción

constante de estabilidad EDDHA/ Fe^{3+} no fueron capaces de determinarla y tan sólo la estimaron ($\log K_{\text{FeL}} > 30$) debido a que la alta estabilidad de dicho quelato hacía imposible su determinación utilizando métodos potenciométricos.

Más adelante, Anderegg y L'Eplattenier, (1964) determinaron la constante de estabilidad del EDDHA/ Fe^{3+} utilizando la competencia entre agentes quelantes ($\log K_{\text{FeL}} = 33,91$). Bannochie y Martell, (1989) separaron y calcularon las constantes de protonación y de estabilidad con diferentes metales, entre ellos el Fe^{3+} , de los isómeros *meso*-EDDHA y *racémico*-EDDHA. Para el cálculo de las constantes de estabilidad con Fe^{3+} utilizaron un método espectrofotométrico. Además usan el pFe ($\text{pFe} = -\log \text{Fe}^{3+}$) como parámetro para estimar la estabilidad del quelato, así cuanto mayor es el pFe, menos metal libre deja en el medio y por lo tanto más estable es el quelato. Este índice da una información más real sobre la estabilidad del quelato que la propia constante de estabilidad. Posteriormente Bannochie y Martell, (1991) emplearon la misma metodología para separar y caracterizar los isómeros del TMPHPG, agente quelante análogo al EDDHA. Ahrlund et al. (1990) determinaron las constantes de estabilidad de los diferentes isómeros del EDDH4MA/ Fe^{3+} . La secuencia de estabilidad obtenida fue contraria a la obtenida en el caso del EDDHA, de tal forma que el *rac*-EDDHA/ Fe^{3+} y el *meso*-EDDH4MA/ Fe^{3+} resultaban ser los isómeros más estables.

La misma metodología ha sido empleada para caracterizar agentes quelantes análogos al EDDHA (HBED y sus análogos) (L'Eplattenier et al., 1967; MacMillan et al., 1974; Taliaferro y Martell, 1984; Clark y Martell, 1988; Motekaitis, et al., 1989; Motekaitis et al., 1990; Motekaitis et al., 1991; Ganeshpure et al., 1992; Ma y Martell, 1993; Ma et al. 1994a, 1994b). Este tipo de compuesto, análogos al HBED, no presentan carbonos quirales y en ellos se ha estudiado el efecto de la variación en la estructura molecular sobre su capacidad de complejación. Sin embargo este mismo estudio todavía no se ha realizado en los agentes quelantes análogos al EDDHA y sería conveniente con el fin de determinar la capacidad complejante de los agentes quelantes ya existente pero no caracterizados (EDDHSA, *p,p*-EDDHA, *o,p*-EDDHA) como de aquellos de nueva síntesis (Sierra et al., 2002).

1.5.2. pM^{n+} y Especiación

Como se ha comentado anteriormente, existen otros parámetros que definen mejor la estabilidad del agente quelantes con un determinado metal. Bannochie y Martell, (1991) utilizan el pFe como parámetro que define la estabilidad del EDDHA/ Fe^{3+} . Como estos autores trabajan en disolución, dicho parámetro sólo depende de la constante de estabilidad del metal involucrado y de las constantes de protonación del agente quelante.

De igual forma, cuando se realiza la distribución de las diferentes especies que forman el quelato, Martell y Motekaitis, (1992) lo obtiene en un sistema en disolución.

Sin embargo cuando un quelato se aplica en un cultivo hidropónico o en un sistema suelo/planta son muchos los factores que hacen variar la estabilidad intrínseca del quelato. Por lo tanto sería más real el cálculo del pFe y la distribución de las especies utilizando en un sistema que incluya la mayoría de los equilibrios que están presentes en las condiciones reales donde se aplican y que afecten a la estabilidad del quelato férrico.

1.5.2.1 Modelos de especiación química

La especiación química es una técnica que permite obtener la distribución de un

componente dado en sus especies individuales. Es por tanto una herramienta fundamental para predecir el impacto de los distintos compuestos (como los quelatos) en el sistema donde estén incluidos. Para realizar el proceso de especiación es necesario establecer los distintos equilibrios químicos que reaccionan las especies individuales. El uso de modelos de especiación química no está lo suficientemente extendido en las investigaciones de química del suelo, ya que algunos autores inciden en el hecho de que el equilibrio no se alcanza nunca en suelo. Sin embargo,

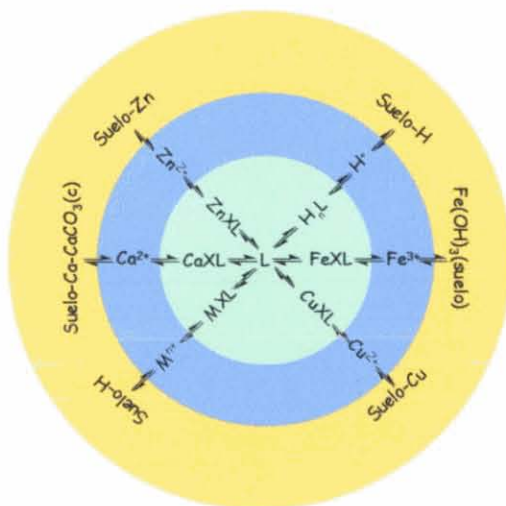


Figura 1.11. Diagrama de las reacciones de equilibrio de los iones metálicos y los quelatos en suelos (Lindsay, 1979). I: especies con agente quelante. II: iones libres. III: fases sólidas.

1. Introducción

Lindsay (1979) indica que, a pesar de no establecerse nunca dicho equilibrio, su conocimiento es básico para conocer hacia donde evoluciona nuestro sistema. Además las reacciones en disolución son por lo general más rápidas y su equilibrio en el suelo si se alcanzaría.

Dada la complejidad del sistema suelo es necesario recurrir a programas informatizados de especiación, entre ellos (GEOCHEM, SOILCHEM, ALCHEMI, CHESS, GMIN, LEACHM, etc). MINTEQA2 (Allison et al. 1990) contiene una base de datos modificada por Lindsay, (1979) en la cual se recogen además de los equilibrios de reacciones que involucran sólidos particulares del suelo, los equilibrios de agentes quelantes como DTPA, EDTA y EDDHA, entre otros. Debido a la inclusión de estos compuestos, se pueden obtener los diagramas de estabilidad de sus quelatos frente a pH en distintas condiciones del suelo. De esta manera se puede conocer la concentración de elemento que permanece quelado en función de la fase sólida que controle su solubilidad en el suelo. La figura 1.11. representa los equilibrios que interrelacionan el metal con el ligando en un suelo señalando la importancia de las fases sólidas.

El empleo de estos modelos sobre quelatos férricos de nueva síntesis sirven para predecir la estabilidad y reactividad de estos compuestos en situaciones reales, de tal forma que sirva de herramienta para ayudar a seleccionar, previamente a su comercialización y a su aplicación, el tipo de quelato que más se adecua a las situaciones concretas.

1.5.3. Estabilidad del quelato férrico

Cuando un quelato férrico es aplicado al medio (cultivo hidropónico o suelo), son varios los factores que afectan sobre su estabilidad. Álvarez-Fernández, 2000 hace una revisión extensa de estos principales factores así como de los que influyen en la degradación del quelato férrico.

A modo de resumen se pueden decir que:

- El intervalo de pH en el cual es estable el quelato férrico depende del agente quelante (Hjelte y Aminken, 1989; Cadahía et al., 1987; Lucena et al., 1991a)

- Tanto los ligandos como el Fe van a sufrir la competencia de otros aniones y metales presentes en la disolución. En suelos calizos ha de tenerse en cuenta la posible sustitución del Fe quelado por el Ca y Mg presentes en la disolución. La presencia de cantidades elevadas de Cu, Mn y Zn y concentraciones bajas de Fe-EDDHA origina la formación de quelatos de esos micronutrientes con el EDDHA, pudiendo llegar a provocar clorosis férrica en los cultivos, sobre todo si la cantidad de Cu es importante (Tong et al., 1986).
- La degradación afecta fundamentalmente a la parte orgánica de la molécula (ligando). Se trata de un proceso lento, Lahav y Hochberg (1975) comprueban que el EDDHA permanece inalterado en suelos durante más de dos meses. Hernández-Apaolaza (1997) no encontró pérdidas de Fe-EDDHA en productos comerciales de 25 años, conservados en forma sólida. Factores como la biodegradación y la fotodegradación pueden afectar sobre la estabilidad de estos quelatos.
- La reactividad de los quelatos férrico en el suelo depende de los procesos de adsorción a los diferentes componentes del suelo (carbonato cálcico, arcillas, óxidos e hidróxidos y materia orgánica). De los estudios realizados por Álvarez-Fernández, 1995; Álvarez-Fernández et al., 1996; Álvarez-Fernández et al., 1997; Hernández-Apaolaza, 1997 se desprende que la presencia de materiales orgánicos, arcillas tipo montmorillonita-Ca y óxidos de hierro (ferrihidrita) intervienen de forma considerable en la adsorción de quelatos férricos Fe-EDDHA y Fe-EDDHMA en suelos.

Como se ha podido comprobar son muchos los factores que afectan sobre la estabilidad y persistencia de un quelato férrico además de estabilidad de dicho quelato. Sin embargo es evidente que la estabilidad es un factor decisivo. Si un quelato no es suficientemente estable no permanecerá en disolución en condiciones agronómicas. Es por eso que centramos nuestro trabajo en este aspecto.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

Nuestro equipo de trabajo, en colaboración con el del Dr. Sierra del Departamento de Química Orgánica de la Universidad Complutense de Madrid, está colaborando en la síntesis, caracterización y aplicación de nuevos y tradicionales quelatos con fines agrícolas de modo que se obtengan metodologías más económicas y con menor impacto ambiental para la corrección de la clorosis férrica. En concreto, este trabajo es parte central de dichas investigaciones en las que nos proponemos como objetivos:

- Objetivo 1 -

PONER A PUNTO UNA METODOLOGÍA PARA CARACTERIZAR LOS QUELATOS FÉRRICOS, ANÁLOGOS A DI(2-HIDROXIFENIL) AMINOACÉTICOS, Y PREDECIR SU COMPORTAMIENTO EN CONDICIONES AGRONÓMICAS.

Para desarrollar esta metodología es necesario realizar unas determinaciones analíticas previas sobre el agente quelante y, a continuación realizar un estudio de su comportamiento en condiciones agronómicas. Para conseguir esto es necesario;

Objetivo 1.1. Puesta a punto de un método analítico para determinar la capacidad complejante del agente quelante con Fe^{3+} .

Objetivo 1.2. Puesta a punto de un método analítico para determinar las constantes de formación del agente quelante: constantes de protonación, constantes de estabilidad de los quelatos con Fe^{3+} y con los metales que puedan afectar a su estabilidad en condiciones agronómicas (Ca^{2+} , Mg^{2+} y Cu^{2+}).

Objetivo 1.3. Determinación del pM ($-\log(M^{''})$) como índice de estabilidad del quelato en condiciones de disolución y en condiciones agronómicas.

2. Objetivos

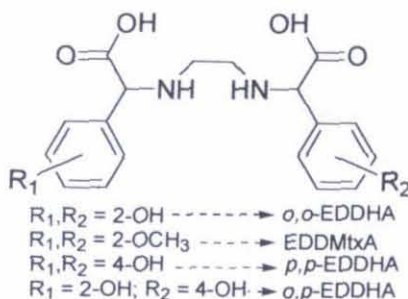
Objetivo 1.4. Estabilidad de los quelatos férricos en diferentes condiciones agronómicas mediante su modelización.

Con la metodología adecuada para caracterizar y estudiar la estabilidad de los agentes quelantes, ésta se podrá aplicar tanto sobre los quelatos férricos ya existentes en el mercado cómo para realizar una investigación sobre nuevas formulaciones con el fin de encontrar nuevos quelatos férricos eficaces para corregir la clorosis férrica.

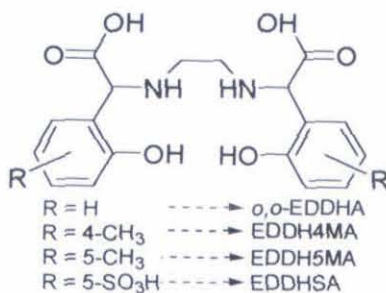
- Objetivo 2 -

EFFECTO DE LAS MODIFICACIONES EN LA ESTRUCTURA MOLECULAR DEL AGENTE QUELANTE SOBRE SU CAPACIDAD PARA COMPLEJAR Fe^{3+} .

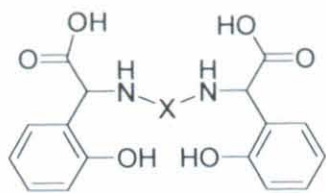
- Ácidos etilendiamino -di(fenilacéticos) con sustitución total o parcial del grupo fenolato con el hidroxilo en *orto* respecto de la cadena de carácter aminocarboxílico.



- Ácidos etilendiamino-di(2-hidroxifenilacéticos) distintamente sustituidos en el anillo aromático.



- Ácidos di(2-hidroxifenil)aminoacéticos con los grupos aminos unidos por cadenas hidrocarbonadas de diferente longitud y estructura.



$X = (\text{CH}_2)_2 \rightarrow o,o\text{-EDDHA}$

$X = (\text{CH}_2)_3 \rightarrow \text{PDDHA}$

$X = (\text{CH}_2)_4 \rightarrow \text{BDDHA}$

$X = \text{H}_2\text{C}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2 \rightarrow p\text{-XDDHA}$

CAPÍTULO 3

METHODOLOGY TO SCREEN NEW IRON CHELATES. PREDICTION OF THEIR BEHAVIOR IN NUTRIENT SOLUTION AND SOIL CONDITIONS

3. Methodology to screen new iron chelates. Prediction of their behavior in nutrient solution and soil conditions.	pág.
3.1. Abstract	39
3.2. Introduction	39
3.3. Materials and Methods	41
3.3.1.General	41
3.3.2.Determination of the Purity	42
3.3.3.Determination of Thermodynamic data by Potentiometry	42
3.3.4. Determination of Thermodynamic data by Spectrophotometry	42
3.3.5.pFe and species distribution	43
3.4. Results and Discussion	44
3.4.1.Titrimetric Purity	44

3. Methodology to screen new Iron Chelates

3.4.2. Protonation and stability constants	45
3.4.3. Species distribution	47
3.5 Conclusion	49

3.1. ABSTRACT

Iron chelates analogous to ethylenediamino-di(orthohydroxyphenyl)acetic acid (EDDHA) are the fertilizers chosen to treat iron chlorosis of crops grown on calcareous soils. Characterisation of these synthetic ligands should be made to establish their chemical behaviour and efficiency as chlorosis correctors. The aim of this research was to develop an appropriate methodology to screen new iron chelates using analytical determinations and chemical equilibrium concepts. EDDHA/ Fe^{3+} , EDDH4MA/ Fe^{3+} , EDDH5MA/ Fe^{3+} and PDDHA/ Fe^{3+} chelates were compared to check the proposed methodology. Titrimetric purity, protonation and, Ca, Mg and Fe^{3+} stability constants, pFe and species distribution in nutrient solution and soil conditions were determined.

The iron chelate stability constants were in order EDDHA > EDDH4MA > EDDH5MA > PDDHA. When pFe was calculated, the larger value corresponds to EDDHA/ Fe^{3+} chelate at pH below 8; but at pH above 8 the EDDH4MA/ Fe^{3+} shows the larger pFe values. When the species was plotted against pH, the dominant species was FeL^- at the physiological pH range in all cases. The pH at a FeL/L_T ratio of 80 % in both $\text{Fe}(\text{OH})_{3\text{amorp}}$ and Fe_{soil} systems was considered as an iron chelate stability index. This index was EDDH4MA > EDDH5MA > EDDHA > PDDHA in both systems, but shows that all of the chelates tested were sufficiently stable in most soil and nutrient solution conditions.

In conclusion, the proposed procedure is adequate for the preliminary evaluation of the synthetic chelating agents, using important parameters such as analytical and speciation properties to predict their chelating behaviour and efficiency in nutrient solution and soil conditions.

3.2. INTRODUCTION

Iron chelates derived from ethylenediamine-di(ortho-hydroxyphenyl)acetic acids (EDDHA) are the fertilizers chosen to treat iron-chlorosis (Mengel and Kirby, 2001.). Iron chlorosis is a nutritional disorder of Fe in plants characterized by a significant decrease in chlorophyll that reduces yield in many crops (Chaney, 1984). The

3. Methodology to screen new Iron Chelates

performance of iron sources used to correct chlorosis depends on the soil type and the chemical properties and/or purity of these products. It has also long been known that competing cations such as Ca^{2+} and Mg^{2+} may displace Fe^{3+} from some chelates, rendering it unavailable because of its precipitation in high pH soils.

To study the commercial chelates/ Fe^{3+} , several methods have been described; using Atomic Absorption (AAS) and UV-visible spectrophotometry (Hernández-Apaolaza et al. 2000), as well as methodologies based on the reactivity of the chelates (Lucena et al., 1992a; Lucena et al., 1992b; Álvarez-Fernández et al., 1997). High Performance Liquid chromatography (HPLC) (Barak y Chen, 1997; Lucena et al., 1996; Hernández-Apaolaza et al., 1997) has also been used.

The 98/3/EC directive regulates the iron fertilizers and other micronutrient chelates used as they are or incorporated in mixed fertilizers. Six chelating agents, all polyamine-carboxylic acids, are permitted for this purpose: EDTA, DTPA, HEDTA, EDDHA, EDDH4MA and EDDCHA.

The analytical techniques reported above are useful in quantifying the chelates in commercial products, but, they are not useful in comparing iron chelate behaviour with different chelating agents. For this propose, the methodologies reported are principally biological tests (Álvarez-Fernández, 2000), but they depend on many factors (soil properties, plant development, weather conditions and so on) that can be greatly affecting the effectiveness of the iron chelates under study. In addition, solubility tests, stability in solution conditions ((Lucena et al., 1992a; Lucena et al., 1992b), pH-Ca stability and the interactions of the chelating agents with different soil materials (Álvarez-Fernández et al., 1997) were also used. However, chelating agents from commercial chelates containing a large number of impurities are usually employed; thus, their stability is significantly affected (Cremonini et al., 2001; Álvarez-Fernánadez et al., 2002). For this reason it is advisable to use chelating agents of high purity and to model their chemical stability in order to predict their soil reactivity and plant response.

The aim of this paper is to develop a methodology to screen iron chelates through analytical determinations and speciation in agronomic conditions. The well known ligands EDDHA and EDDH4MA (see 1 and 2 in figure 3.1.) as well as the new ones EDDH5MA and

PDDHA (see 3 and 4 in figure 3.1.) were chosen to check the proposed methodology. More detailed applications will soon be published.

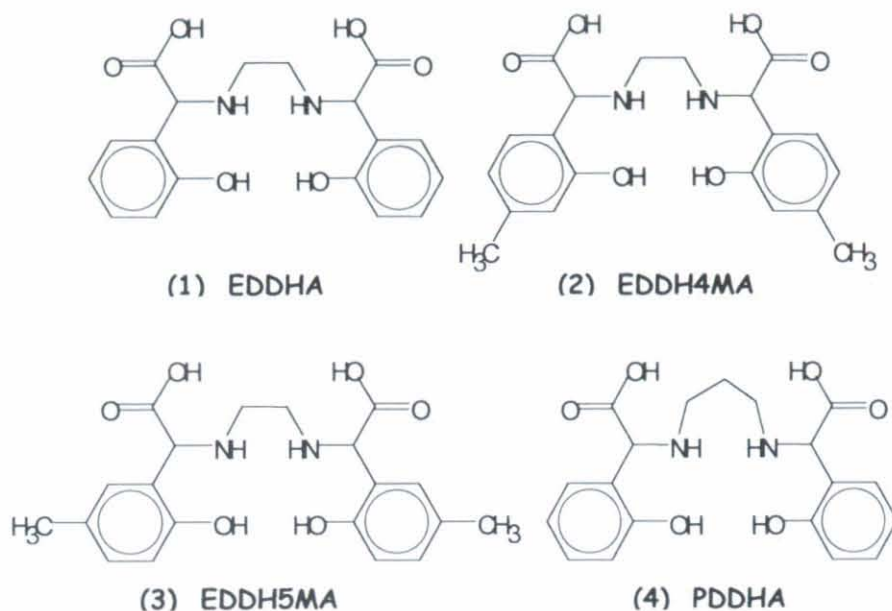


Figure 3.1. Structure of the ligands

3.3. MATERIALS AND METHODS

3.3.1. General

Chelating agents used in this research study were synthesized according to Sierra et al., 2002.

Potentiometric measurements and purity determinations were performed with a Metrohm 719 and/or 721 potentiometers and a Metrohm combined pH glass. Spectrophotometric titrations and Fe^{3+} stability constants were carried out using a Metrohm 662 spectrophotometer. Both potentiometers were controlled by a TiNet 2.4 software for PC.

All reagents used in this work were of analytical grade. All aqueous solutions were prepared with water according to type I grade (ASTM standards, 1995). The temperature was maintained at $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$, and the ionic strength was adjusted to

3. Methodology to screen new Iron Chelates

0.100 M by the addition of NaCl. Chelating agent solutions were prepared under N₂ atmosphere. CaCl₂, MgCl₂, NaCl, NaOH, HCl and Fe³⁺ standard solution were obtained from Merck Chemical Co. Fe³⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ solutions were standardized by Atomic Absorption Spectroscopy (AAs) with a Perkin Elmer Analyst 800 spectrophotometer.

3.3.2. Determination of the Purity

Chelating agent solutions 1.00·10⁻⁴M were prepared and the pH was adjusted to 6 by the addition of 2mM MES buffer [2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid].

The test solution (60 ml) was contained in a 150-mL thermostated jacketed reaction vessel with an airtight cap fitted with gas inlet and outlet tubes, the combined pH glass electrode, the white light spectrod and two piston burettes, tip extending below the surface of the solution, and a magnetic stirrer. The photometric titration consists of the addition of 4.47·10⁻⁴ M Fe³⁺ standard solution to the chelating agent until the absorbance at 480 nm presents no changes. End-point titration was calculated for two linear segments' intersection (Willard et al., 1988). Molar absorptivities for the chelates were also determined at 480 nm.

3.3.3. Determination of Thermodynamic data by Potentiometry

Potentiometric titrations were described in detail elsewhere (Martell y Motekaitis, 1992). Four equivalents of standard base (0.200 M) were added to the solution in order to dissolve the ligand. 10-20 mg chelating agents were dissolved to determine the protonation constants. When needed, Ca or Mg solution were added in ligand:metal [1:1] and [1:10] ratio to determine their stability constants. The solutions were diluted to a final volume of 50.0 ml. A volume of 25 ml of the experimental solution was back-titrated to pH 2.5 or until precipitation of ligand occurred with aqueous 0.0500 M HCl.

All formation constants, except for the protonation constants corresponding with phenol dissociation, were calculated using the FORTRAN program BEST (Motekaitis and Martell, 1982) (described in detail elsewhere (Martell and Motekaitis, 1992).

3.3.4. Determination of Thermodynamic Data by Spectrophotometry

The first and second protonations occur at high pH, where potentiometric measurements become inaccurate. Then their protonation constants were determined spectrophotometrically, since the combination of protons with the phenolic groups are accompanied by extensive changes in the absorption spectra (L'Eplattenier et al., 1967). For each ligand, ten $1 \cdot 10^{-4}$ M solutions were prepared with the ionic strength adjusted to 0.100M with NaCl and pH adjusted from 10.5 to 13.5 with 0.3-0.5 pH intervals. 250 - 400 nm spectra were obtained in a Shimadzu UV-VIS spectrophotometer. Absorbance measurements were recorded at the wavelength maximum of each chelating agent solution. Similarly, the molar absorptivities of L^{4-} and LH_2^{2-} species were estimated at pH 13.5 and 10 respectively (at these pH values the other species are lower in concentration). The protonation constants and molar absorptivities for the phenolic protons (first and second association constants) were determined with an in-house fitting program using Solver tool of Excel®.

Finally, iron chelate solutions of $1.00 \cdot 10^{-4}$ M were prepared as a 1:1 complex. The solutions were titrated with aqueous 0.200 M NaOH titrant from pH 2 (or from pH where iron chelate was colourless) to pH 12. The absorbance measurements of the solutions were recorded at 480 nm at each 0.05-0.1 pH interval, depending on the curve zone. The stability constants (K_{FeL} , K_{FeHL} and $K_{Fe(OH)L}$) were calculated from the data by the use of an in-house program using Microsoft Excel Solver® (Maleki et al., 1999)

3.3.5. pFe and Species Distribution

A comparison of the total sequestering ability of the ligands can be made through the calculation of pFe values, where $pFe = -\log [Fe^{3+}]$. The pFe and species distribution in several conditions were obtained using the equilibrium speciation model MINTEQA2 program (Allison et al., 1990). Both component and thermodynamic databases were modified in order to include the ligands and species formed respectively. Hoagland nutrient solution composition was used to calculate pFe and species distribution at 4-13 pH range ($[Fe^{3+}] = [Ligand] = 1.00 \cdot 10^{-4} M$; $[Ca] = 1.60 \cdot 10^{-3} M$ and $[Mg] = 8.00 \cdot 10^{-4} M$).

Additionally, in order to study the behaviour of the iron chelates in nutrient solution and soil conditions, the species distribution was plotted using Hoagland nutrient

3. Methodology to screen new Iron Chelates

solution again but in these cases $\text{Fe(OH)}_{3\text{amorp}}$
 $[\text{Fe(OH)}_{3\text{amorp}} + 3\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Fe}^{3+} + 3\text{H}_2\text{O} \quad \log K^0 = 3.54]$ and Fe_{soil}
 $[\text{Fe(OH)}_{3\text{soil}} + 3\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Fe}^{3+} + 3\text{H}_2\text{O} \quad \log K^0 = 2.70]$ equilibriums were introduced into the
models respectively as possible solids controlling the solubility of Fe^{3+} (Lindsay, 1979).

3.4. RESULTS AND DISCUSSION

3.4.1. Titrimetric Purity

Titrimetric purity of the chelating agents and molar absorptivities are shown in Table 3.1. All products show a high purity, from 87% to 95% and their molar absorptivities are also close to those published elsewhere for EDDHA and EDDH4MA (Ahrland et al., 1990).

Table 3.1. Purity^a (%) for chelating agents determined by spectrophotometric titration.

Chelating Agents	Titrimetric Purity (%)	Molar Absorptivity (M^{-1})
EDDHA	90.6 ± 0.3	4721
EDDH4MA	92.4 ± 0.1	4528
EDDH5MA	87.6 ± 0.1	4443
PDDHA	95.5 ± 0.9	4652

^a $\mu = 0.1 \text{ M (NaCl)}$; $\dagger = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

The method used to determine the purity was adequate to characterise these products because it is based on the high stability of the chelate/ Fe^{3+} . The purity of the chelating agents was also determined by potentiometry with Cu^{2+} as titrant solution in order to test and to compare both titrimetric methods (data not showed).

Due to their high degree of purity, the ligands used may serve as standards for the analysis and quantification of commercial chelates (Sierra et al., 2002).

3.4.2. Protonation and Stability Constants

Protonation and stability constants are shown in Table 3.2. The first two protonations, K_1^H and K_2^H , correspond to phenolate oxygen protonations and were determined spectrophotometrically from the ultraviolet absorption band at 295 nm. Log K_3^H and K_4^H were determined by potentiometric back-titration and correspond to the protonation constants of the secondary amine nitrogens (Bannochie and Martell, 1989). It is not possible to obtain the protonation constants corresponding to the carboxylate oxygens because, after addition of the fourth equivalent of acid in the back-titration, precipitation was observed. Since all chelating agents in this study have the same functional groups, their protonation constants were similar. The methyl group in benzene ring could slightly increase the basicity, depending on its relative position (phenol, $pK_a = 10.00$; 3-methylphenol, $pK_a = 10.09$; 4-methylphenol, $pK_a = 10.26$); this effect is so small since no intramolecular interactions occur. EDDHA and EDDH4MA protonation constants were similar to those previously published (Lindsay, 1979; Bannochie and Martell, 1989).

Ca and Mg stability constants are shown in Table 3.2. From the Ca and Mg potentiometric curves, one may assume the presence of at least three forms of the metal chelates MH_2L , MHL^- and ML^{2-} . Ca and Mg are not effectively bound unless at least two protons are displaced from the ligand (Frost et al., 1958). If ML^{2-} species were compared, Mg chelate stability constants are higher than that of Ca for all products. The product that presents the highest Ca and Mg constants is the EDDHA.

For the determination of chelates/ Fe^{3+} formation, several authors used the ligand-competition method based on the ligand ability between two similar Fe^{3+} chelating agents (Bell et al., 1991; Anderegg and L'Eplattenier., 1964). However, the spectrophotometric technique used here is faster than the competition method, because in the latter, the equilibrium conditions between both chelating agents should be established. Since these products are degraded quickly in the light, a faster method is needed to obtain reliable constants. FeL^- , $FeHL$ and $FeOHL^{2-}$ species have been determined for the proposed method. Fe^{3+} stability constants are presented in Table 3.2. The iron chelate stability constants were in the sequence $EDDHA > EDDH4MA > EDDH5MA > PDDHA$. The stability differences depend on the chelate/ Fe^{3+} structure formed. The presence of the propylene chain length in PDDHA produces a decrease in the Fe^{3+} stability with respect

3. Methodology to screen new Iron Chelates

to EDDHA. The chelate ring size formed for EDDHA/ Fe^{3+} (five-membered chelate ring) is more stable than that of PDDHA/ Fe^{3+} (six-membered chelate ring). In all chelates/ Fe^{3+} formed, the FeHL and FeOHL^{2-} species are predominant at pH less than 2.0 and higher than 11.40, respectively. Therefore the predominant specie is FeL^- in the whole physiological pH range. The EDDHA/ Fe^{3+} constant value (35.09) and EDDH4MA/ Fe^{3+} (34.44) present similar values as those published previously (Ahrland et al., 1990; Bannochie and Martell, 1989), indicating that the spectrophotometric method can be used to determine Fe^{3+} constants.

Table 3.2. log Protonation and log Stability Constants^a of Divalent and Trivalent Metals Ions with chelating agents

Quotient	EDDHA	EDDH4MA	EDDH5MA	PDDHA
$\frac{[\text{LH}^{3-}]}{[\text{H}^+][\text{L}^{4-}]} \Rightarrow K_1^H$	11.94(0.001) ^b	11.63(0.007)	11.89(0.001)	12.17(0.001)
$\frac{[\text{LH}_2^{2-}]}{[\text{H}^+][\text{LH}^{3-}]} \Rightarrow K_2^H$	10.73(0.001)	10.48(0.007)	10.78(0.001)	11.08(0.001)
$\frac{[\text{LH}_3^-]}{[\text{H}^+][\text{LH}_2^{2-}]} \Rightarrow K_3^H$	8.66 ± 0.04	8.73 ± 0.01	8.71 ± 0.11	8.79 ± 0.02
$\frac{[\text{LH}_4]}{[\text{H}^+][\text{LH}_3^-]} \Rightarrow K_4^H$	6.18 ± 0.06	6.40 ± 0.13	6.55 ± 0.13	7.07 ± 0.11
$\frac{[\text{CaL}^{2-}]}{[\text{Ca}^{2+}][\text{L}^{4-}]}$	7.29 ± 0.30	5.84 ± 0.28	6.65 ± 0.57	6.17 ± 0.19
$\frac{[\text{CaLH}^-]}{[\text{Ca}^{2+}][\text{H}^+][\text{L}^{4-}]}$	16.77 ± 0.33	15.86 ± 0.07	16.76 ± 0.58	16.43 ± 0.40
$\frac{[\text{CaLH}_2]}{[\text{Ca}^{2+}][\text{H}^+]^2[\text{L}^{4-}]}$	25.95 ± 0.50	24.58 ± 0.17	26.22 ± 0.78	25.86 ± 0.40
$\frac{[\text{MgL}^{2-}]}{[\text{Mg}^{2+}][\text{L}^{4-}]}$	9.76 ± 0.05	8.00 ± 0.02	7.83 ± 0.08	8.81 ± 0.08
$\frac{[\text{MgLH}^-]}{[\text{Mg}^{2+}][\text{H}^+][\text{L}^{4-}]}$	18.18 ± 0.15	17.06 ± 0.15	16.88 ± 0.10	17.33 ± 0.27
$\frac{[\text{MgLH}_2]}{[\text{Mg}^{2+}][\text{H}^+]^2[\text{L}^{4-}]}$	25.36 ± 0.24	24.81 ± 0.06	25.28 ± 0.37	25.57 ± 0.64
$\frac{[\text{FeL}^-]}{[\text{Fe}^{3+}][\text{L}^{4-}]}$	35.09 ± 0.28	34.44 ± 0.06	33.66 ± 0.01	33.54 ± 0.23
$\frac{[\text{FeHL}]}{[\text{Fe}^{3+}][\text{L}^{4-}][\text{H}^+]}$	36.89 ± 0.21	36.59 ± 0.07	36.41 ± 0.10	35.84 ± 0.22
$\frac{[\text{FeOHL}^{2-}]}{[\text{Fe}^{3+}][\text{L}^{4-}][\text{OH}^-]}$	23.66 ± 0.27	22.81 ± 0.13	21.98 ± 0.01	21.74 ± 0.14

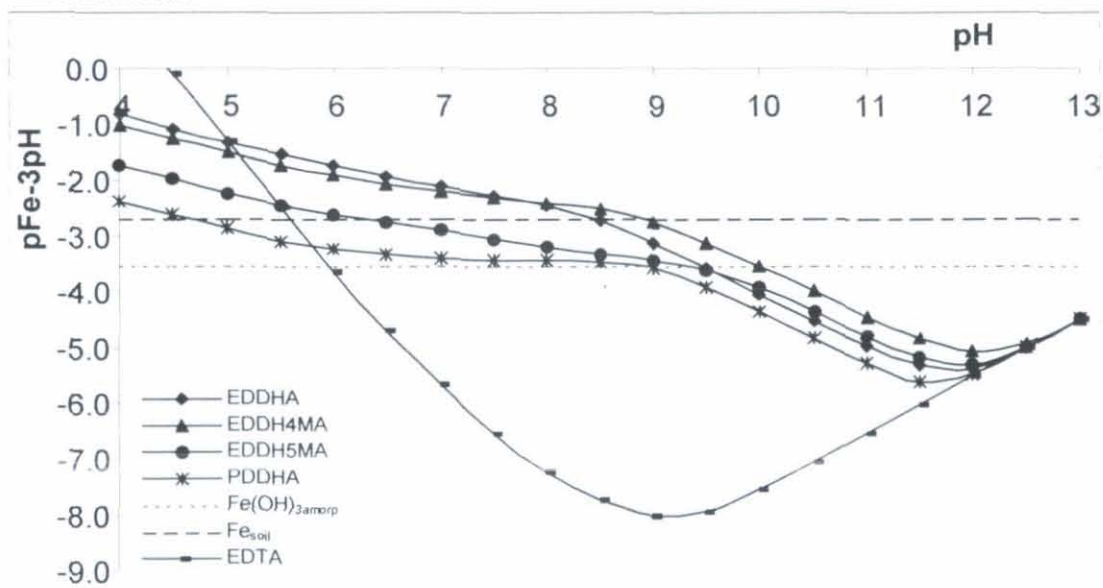
^a $\mu = 0.1 \text{ M}$ (NaCl); $\dagger = 25^\circ \text{C}$.

^bValues in parentheses indicate σ_{fit} values calculated in accordance with Martell y Motekaitis, 1992.

3.4.3. Species Distribution

The comparison of stability constants only gives approximate information of the chelating agents behaviour. The actual behaviour of the chelating agents should be studied in nutrient solutions and soil conditions. This can be achieved by modelization. The pFe was calculated using a Hoagland nutrient solution as a theoretical nutrition media (Halvorson and Lindsay, 1972). A higher ligand iron affinity is reflected by a greater pFe value (pFe-3pH values instead of pFe were shown in figure 3.2 in order to have a better visualization of the comparison among chelates). At pH lower than 8 the larger pFe corresponds to EDDHA chelate but at pH higher than 8 the EDDH4MA chelate shows the larger pFe values. PDDHA produces the lowest pFe values in the whole pH range, in accordance with their lower stability constants.

Figure 3.2. pFe-3pH against pH for EDDHA, EDDH4MA, EDDH5MA, PDDHA and EDTA chelating agents. Theoretical data obtained using Hoagland nutrient solution in the model



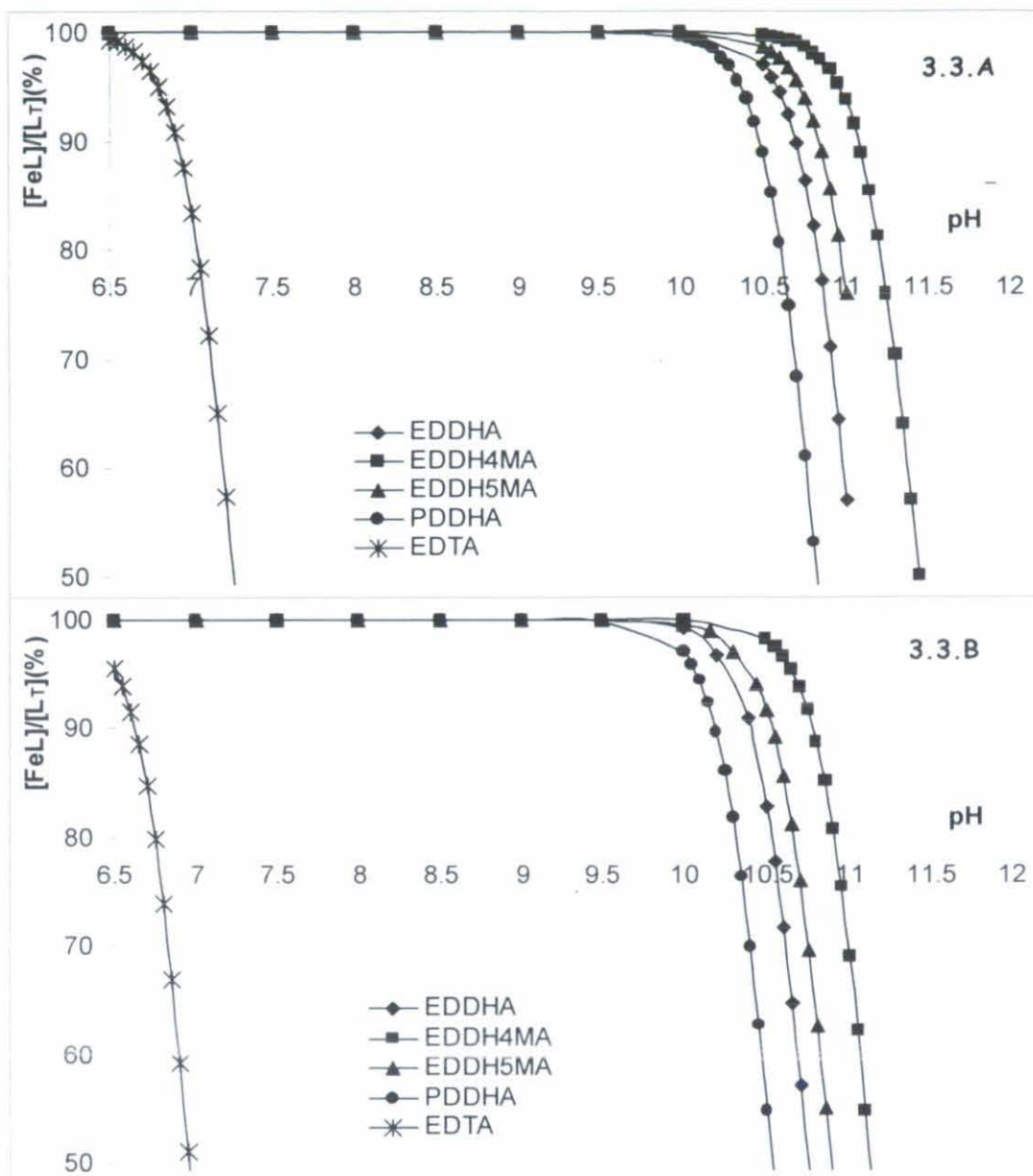
When pFe from these chelates were compared with those of EDTA (also included in figure 3.2), at pH above 6 the pFe from analogous ligands to EDDHA were always higher than those of EDTA (Figure 3.2). pFe-3pH line for Fe(OH)_{3amorp} (for nutrient solution) and Fe-soil (for soils) (Lindsay, 1979) were calculated in order to predict the

3. Methodology to screen new Iron Chelates

pH of nutrient solution or soil to which each Fe-chelate precipitated. These precipitation values are a qualitative index because it does not inform about the amount of Fe-chelate that could precipitate. Theoretically, when $pFe-3pH$ value of the chelate is lower than that of the mineral, oversaturation occurs and the precipitation and mineral solid phase will control the solubility of Fe^{3+} . When the distribution of the ligand in individual species was considered against pH, the dominant species was FeL^- at the agronomic pH range in all cases (data not shown). This data refers only to species in solution. For this reason, the pH at a FeL/L_T ratio of 80% in a equilibrium system of each iron chelate in the presence of $Fe(OH)_{3amorp}$ (Figure 3.3.A) or Fe-soil (Figure 3.3.B) was also considered as an iron chelate stability index. This index was $EDDH4MA > EDDH5MA > EDDHA > PDDHA$ in both systems, but showing that all chelates tested are sufficiently stable in most soil and nutrient solution conditions. For EDTA in equilibrium with $Fe(OH)_{3amorp}$, the FeL/L_T ratio is lower than 80% at pH below 7.05, whereas in equilibrium with Fe-soil the same ratio is lower than 80% below pH 6.75 (figure 3.3A. and 3.3.B respectively). These pH differences between phenolate bearing ligands (EDDHA, EDDH4MA, EDDH5MA and PDDHA) and EDTA are directly related to the iron chelates stability and consequently to the iron availability to the plant. If $EDTA/Fe^{3+}$ was used as an iron chlorosis corrector at pH over 7.5 in nutrient solution and soil conditions only 16% and 3% respectively of the total iron supply will be available for the plant. However, if the phenolate-bearing chelating agents were used, 100% of soluble iron is maintained at pH over 10 for both systems indicating that all of the total iron could be available for the plants.

Therefore, using the results obtained, phenolate-bearing chelates ($EDDHA/Fe^{3+}$, $EDDH4MA/Fe^{3+}$, $EDDH5MA/Fe^{3+}$ and $PDDHA/Fe^{3+}$) are more efficient than the unstable $EDTA/Fe^{3+}$ to be applied in soil under agronomic conditions. Since the stabilities of phenolate-bearing chelating agents were similar in nutrient solution and soil conditions, their behaviour will depend on the type of crops where they are applied. Wallace, 1956, 1971 concluded that $EDDH4MA/Fe^{3+}$ chelate was less efficient than $EDDHA/Fe^{3+}$ chelate. However, Reed et al., 1988 did not find differences when $EDDHA/Fe^{3+}$ and $EDDH4MA/Fe^{3+}$ were compared in a peach tree field, although $EDDHA/Fe^{3+}$ is a better iron chlorosis fertilizer than $EDDH4MA/Fe^{3+}$ in vine yards. In any case, the phenolate-bearing chelating agents correct the chlorosis in iron deficient conditions (Álvarez-Fernández, 2000)

Figura 3.3. FeL/L_T against pH. Total chelating agent concentration (L_T) = 10^{-4} M in equilibrium with $Fe(OH)_{3\text{amorp}}$ (3.3.A) and Fe_{soil} (Lindsay, 1979)(3.3.B)



3.5. CONCLUSION

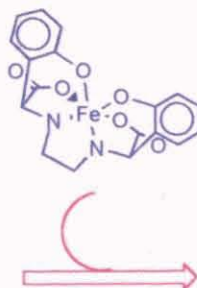
The proposed methodology is adequate to predict the behaviour of the chelating agents, and therefore of commercial formulations as new synthetic chelating agents, in

3. Methodology to screen new Iron Chelates

soil/plant systems. This methodology includes, as the first step, the analytical determinations (purity determination and their formation constants) and then, with these results and using an equilibrium speciation model, to predict the behaviour of this product through pFe calculation and speciation distribution in agronomic pH range. Also the pM value where the precipitation Fe-chelate occurred is a good index to compare iron-chelates.

CAPÍTULO 4

CHELATING AGENTS RELATED TO ETHYLENEDIAMINE
DI(2-HYDROXYPHENYL)ACETIC ACID (EDDHA):
SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND EQUILIBRIUM
STUDIES OF THE FREE LIGANDS AND THEIR Mg^{2+} , Ca^{2+} ,
 Cu^{2+} AND Fe^{3+} CHELATES.



4. Chelating agents related to ethylenediamine di(2-hydroxyphenyl)acetic acid (EDDHA): Synthesis, Characterization and equilibrium studies of the free ligands and their Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+} chelates.	pág
4.1.Table of Contents Synopsis	55
4.2.ABSTRACT	55
4.3.INTRODUCTION	56
4.4.EXPERIMENTAL SECTION	59
4.4.1.General Procedures	59
4.4.1.1. General procedure for the synthesis of imines 3a-e.	60
4.4.1.2. General procedure for the synthesis of aminonitriles 4a-e.	61
4.4.1.3. General procedure for the synthesis of aminoacids 1a, 1c and 1d.	62
4.4.1.4. General procedure for the synthesis of aminoacids 1b and 1e.	64

4.4.2. Determination of the purity of chelating agents	65
4.4.3. Determination of Stability Constants by Potentiometry	65
4.4.4. Determination of Stability Constants by Spectrophotometry	66
4.4.5. pM values and Species Distribution	67
4.5. RESULTS AND DISCUSSION	68
4.4.1. Protonation Constants	70
4.4.2. Ca^{2+} and Mg^{2+} Stability Constants	72
4.4.3. Fe^{2+} and Cu^{2+} Stability Constants	74
4.4.4. pM values and Species Distribution	78
4.6. CONCLUSIONS	82
4.7. SUPPORTING INFORMATION (informative)	83
4.7.1. Determination of the purity of chelating agents by photometric titrations	83
4.7.2. Spectrophotometric Equilibrium Measurements	84
4.7.2.1 Protonation Constants	84
4.7.2.2. Fe(III) and Cu(II) Stability Constants	85
4.7.2.3. pM values	87
4.7.3. Supplementary Figures and Tables	88

4.1. Table of Contents Synopsis.

EDDHA and other structurally related chelating agents have been synthesized by a new synthetic pathway, and their chemical behavior studied in order to predict the effect of the substituents in the benzene ring on their efficacy as iron fertilizers. The proposed synthesis produces chelating agents of high purity. All compound studied, exception made of *p,p*-EDDHA and EDDMtxA, have shown a comparable effectiveness to complex Fe^{3+} indicating that they can be used to correct iron chlorosis in plants.

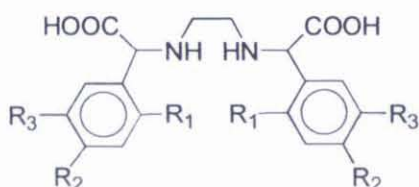
4.2. ABSTRACT

Iron chelates as ethylenediamine-*N,N*di(2-hydroxyphenyl)acetic acid (EDDHA) and their analogues are the most efficient fertilizers to treat iron chlorosis in plants. EDDHA, EDDH4MA (ethylenediamine-*N,N*di(2-hydroxy-4-methylphenyl)acetic acid) and EDDCHA (ethylenediamine-*N,N*di(2-hydroxy-5-carboxyphenyl)acetic acid) are allowed by the European directive, but also EDDHSA (ethylenediamine-*N,N*di(2-hydroxy-5-sulphonylphenyl)acetic acid) and EDDH5MA (ethylenediamine-*N,N*di(2-hydroxy-5-methylphenyl)acetic acid) are present in many commercial iron chelates. In this study these chelating agents as well as *p,p*-EDDHA (ethylenediamine-*N,N*di(4-hydroxyphenyl)acetic acid) and EDDMtxA (ethylenediamine-*N,N*di(2-methoxyphenyl)acetic acid) have been obtained following a new synthetic pathway. Their chemical behavior has been studied to predict the effect of the substituents in the benzene ring on their efficacy as iron fertilizers. The purity of the chelating agents has been determined using a novel methodology through spectrophotometric titration at 480 nm with Fe^{3+} as titrant to evaluate the inorganic impurities. The protonation constants were determined by both, spectrophotometric and potentiometric methods and Ca^{2+} and Mg^{2+} stability constants were determined from potentiometric titrations. To establish the Fe^{3+} and Cu^{2+} stability constants a new spectrophotometric method has been developed and the results compared with those reported in the literature for EDDHA and EDDHMA and their *meso* and *rac*-isomers. pM values have been also determined to provide a comparable basis to establish the relative chelating ability of these ligands. The purity obtained for the ligands is higher than 87% in all cases and is comparable with that obtained by ^1H NMR. No significant differences have been found among ligands

when their protonation and stability constants were compared. As expected, no Fe^{3+} complexation was observed for *p,p*-EDDHA and EDDMtxA. The presence of sulfonium groups in EDDHSA produces an increase in the acidity that affects their protonation and stability constants although the pFe values indicate that EDDHSA is also effective to correct iron chlorosis in plants.

4.3. INTRODUCTION

Iron chelates (Figure 4.1.) derived from ethylenediamine-*N,N*di(2-hydroxyphenyl)acetic acids are the choice fertilizers to treat iron chlorosis (Menguel et al. 2001; Chen and Barak, 1982). This is a nutritional disorder in plants characterized by a significant decrease of chlorophyll in leaves that reduces the yield and quality of many crops (Chaney, 1984). Among other causes, iron chlorosis results from the low availability of iron in alkaline soils where this metal is already present in the form of insoluble oxide/hydroxides (Morris et al., 1990). Furthermore, the chlorosis can be induced by the presence HCO_3^- (Yang et al., 1994; Alhendawi et al., 1997; Köseoglu 1995), and by high concentrations of metals as Mn, Cu, Zn, Co, Ni, or Cd that may compete with iron at the level of plant uptake (Schmidt et al 1997; Simon et al. 1994; Moral et al. 1994; Lindsay 1984; Foy 1998 and Terry 1981). The accepted mechanism of remediation of iron chlorosis by iron chelates involves the enzymatic reduction of Fe^{3+} to Fe^{2+} by a Fe(III)-chelate reductase. The outcome of this reduction is the liberation of Fe^{2+} that is absorbed by the roots producing a molecule of free ligand during the process (Moog and Brüggemann 1994).



1a	$\text{R}_1 = \text{OH}; \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{H};$	<i>o,o</i> -EDDHA
1b	$\text{R}_1 = \text{H}; \text{R}_2 = \text{OH}; \text{R}_3 = \text{H}$	<i>p,p</i> -EDDHA
1c	$\text{R}_1 = \text{OH}; \text{R}_2 = \text{Me}; \text{R}_3 = \text{H}$	EDDH4MA
1d	$\text{R}_1 = \text{OH}; \text{R}_2 = \text{H}; \text{R}_3 = \text{Me}$	EDDH5MA
1e	$\text{R}_1 = \text{OMe}; \text{R}_2 = \text{H}; \text{R}_3 = \text{H};$	EDDMtxA
1f	$\text{R}_1 = \text{OH}; \text{R}_2 = \text{H}; \text{R}_3 = \text{SO}_3\text{H}$	EDDSHA
1g	$\text{R}_1 = \text{OH}; \text{R}_2 = \text{H}; \text{R}_3 = \text{COOH}$	EDDCHA

Figure 4.1. Structure of the chelating agents

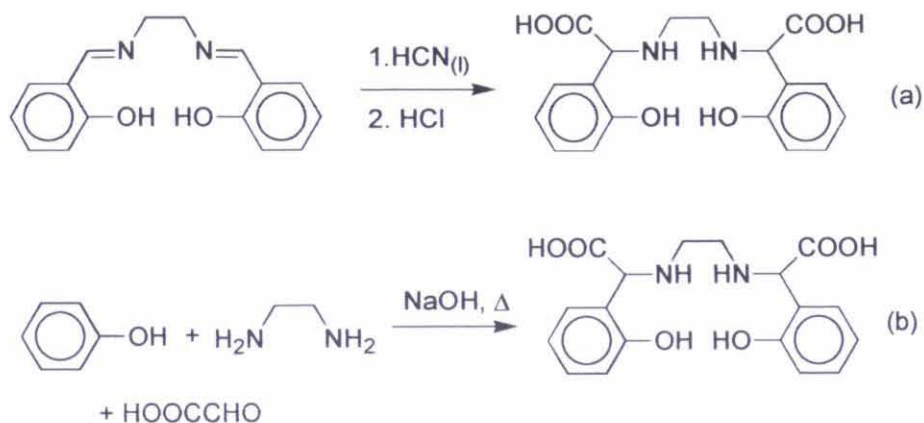
The efficacy of an iron chelate to solve iron chlorosis depends on several factors. The first one is the ability of the compound to chelate other metals existing in soils, like Ca^{2+} , Mg^{2+} and Cu^{2+} . This latter ion is generally present in low concentrations in soils, but becomes a major competitor of Fe^{3+} due to its ability to be chelated by aminoacids. The second factor is the ability of the plant roots to reduce the iron from the chelating agent. This capacity is influenced by the stability of the Fe^{3+} and the Fe^{2+} chelates (Chaney, 1984). Other factors that have to be considered are the ability of the chelating agent in dissolving more native iron present in the soil and the adsorption processes of the chelates into soil materials (Hernández-Apaolaza and Lucena, 2001). To predict the reactivity of iron chelates in soil conditions and their efficiency as correctors of iron chlorosis it is necessary to know their speciation.

The first data about the protonation constants of EDDHA **1a** and the stability constants for its Ca^{2+} , Mg^{2+} and Cu^{2+} complexes were reported by Frost and Martell in 1958 (Frost et al. 1958). As spectrophotometric methods were not used at that time, the stability constants of EDDHA/ Fe^{3+} could not be determined and the two highest protonation constants of **1a** became inaccurate. A further work by Bannochie reported the protonation constants and the stability constants of diastereomeric *meso*-EDDHA and *rac*-EDDHA free ligands and their Fe^{3+} chelates (Bannochie and Martell, 1989). The analogous data for both diastereomers of EDDH4MA have been also reported by Åhrland et al (1990).

The synthesis of EDDHA originally reported by Kroll in 1957, is a Strecker reaction on the diimine derived from ethylenediamine and salicylaldehyde (Eq. **a** in Scheme 4.1) (Kroll et al. 1957; Knell and Kroll, 1961). Although, the procedure can be employed to obtain other substituted EDDHAs (Frost and Freedman, 1959; Knell and Kroll) the drawback of this method is the need of liquid HCN during the industrial process. Other approaches to the synthesis of EDDHAs are based on a Mannich-like reaction between phenol (or substituted phenols), ethylenediamine and glyoxylic acid (Eq. **b** in Scheme 4.1) (Dexter, 1958). This method is used for the preparation of all of the EDDHA derivatives currently in the market. However, this synthesis produces a mixture of regioisomers and polycondensation products in variable amounts depending on the reaction conditions (Álvarez-Fernández et al. 2002). Other approaches to obtain

ethylenediamine-di(hydroxyphenyl)acetic acids are less general (Hoefnagel and van Bekkum 1994).

Scheme 4.1. Synthesis of EDDHA by (a) Kroll (1957) and (b) Dexter, (1958)



The first structural characterization of iron chelates of EDDHA derivatives was made through the study of the $\text{Mg-}[\text{rac-Fe(III)-EDDHA}]_2$ salt. These studies showed that these chelates have an octahedral disposition with the EDDHA ligand **1a**, hexacoordinated to the Fe-nucleus (Bailey et al., 1981). The ferric complexes of the *racemic* and *meso* isomers of EDDHA **1a** are represented in Figure 4.2. This [6,5,6] arrangement of rings across the Fe-center having the phenolic groups in equatorial positions is considerably more favored than the alternative [5,5,5] arrangement. Nevertheless, it has been calculated that 0.5% of the [5,5,5] complex is present in the racemic mixture (Bernauer, 1976). Analogous structures can be assumed for the Fe-chelates of compounds **1c**, **1d**, **1f** and **1g**, assuming a 1:1 stoichiometry of metal-ligand. Stoichiometries higher than 1:1 have been reported for compounds **1f** (Petree and Stutts, 1975) and **1g** (Gorrindo et al. 1994) due to the presence of additional coordinating groups.

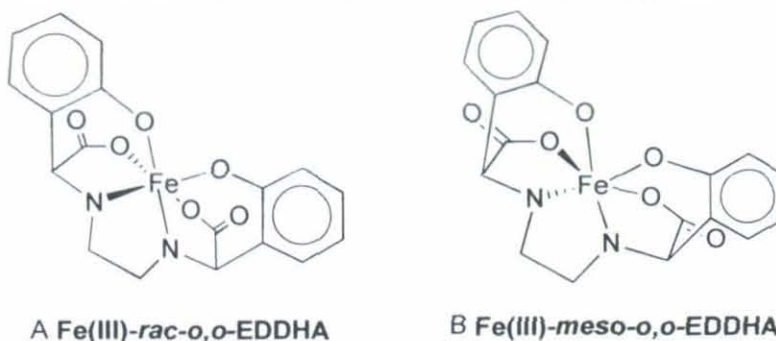


Figure 4.2. Structure of; A) *rac*-EDDHA; B) *meso*-EDDHA

During our ongoing work directed toward the development of new chelating agents for the treatment of iron chlorosis (Sierra et al. 2002), as well as to determinate the presence of impurities in commercial formulations (Álvarez-Fernández et al. 2002), we became aware of the existence of serious discrepancies between the reported data for EDDH4MA (Ahrlund et al. 1990) 1c and our own results. Additionally, data for its positional isomer EDDH5MA 1d, as well as for other benzene-substituted analogs are not known. Furthermore, our recently developed route to synthesize these type of ligands allows us the access to unambiguously characterized pure ligands (Sierra et al. 2002). Reported herein is a general method for the synthesis of EDDHA and other related derivatives starting from different hydroxybenzaldehydes and using trimethylsilylcyanide (TMSCN) as the cyanide transfer agent, as well as the characterization and equilibrium studies of the free ligands and their Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+} chelates using a novel methodology.

4.4. EXPERIMENTAL SECTION

4.4.1. General Procedures

1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded in $CDCl_3$, on a Varian XL-300S (299.94 MHz for 1H and 75.43 MHz for ^{13}C), a Bruker 250-AC (250.13 MHz for 1H and 62.90 MHz for ^{13}C), a Bruker 200-AC (200.13 MHz for 1H and 50.03 for ^{13}C MHz) and a Bruker Avance-300 (300.13 MHz for 1H and 75.48 MHz for ^{13}C) spectrometers. Chemical shifts are given in ppm relative to TMS (1H , 0.0 ppm), or $CDCl_3$ (^{13}C , 77.0 ppm).

4. Chelating agents related to EDDHA

IR spectra were taken on a Perkin-Elmer 781 spectrometer. Potentiometric measurements were performed with a Metrohm 719 and/or 721 potentiometers (precision of 0.1 mV), a Metrohm combined pH glass electrode and an ion selective Cu^{2+} electrode. Photometric titrations were carried out using a Metrohm 662 photometer (resolution of $10 \text{ nm} \pm 0.1 \text{ nm}$) with a white light spectrode of path length $2 \times 10 \text{ mm}$. Both potentiometers were controlled by a TiNet 2.4 software program for PC.

Flame-dried glassware and standard Schlenck techniques were used for oxygen or water sensitive reactions. All reagents used in this work were of analytical grade. All aqueous solutions were prepared with CO_2 -free, water type I grade (ASTM Standards, 1995). CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl , NaOH , CuSO_4 , $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, HCl and Fe^{3+} standard solution were obtained from Merck Chemical Co and they were properly standardized. A Gran's plot analysis (Gran, 1952) was used to check for carbonate contamination of the standard aqueous NaOH and consistently revealed amounts of carbonate lower than 0.5%. The end point of all potentiometric titrations were determined by the Gran's function (Gran, 1952). All titrations were made under inert atmosphere (99.9995 purity grade N_2 , NaOH washed, 0.100 NaCl saturated).

Commercial buffer solutions were used to calibrate the combined pH glass electrode in order to read $-\log(\text{H}^+)$. Therefore, all equilibrium constants are calculated as mixed constants (K^m). The transformation of concentration constants (K^c) or thermodynamic constants (K°) have been readily made using the activity coefficients from Davies' equation.

All commercially available organic reagents were used without further purification. EDDHSA 1f was supplied by DABEER.

Caution: HCN is produced by reaction of Trimethylsilyl Cyanide (TMSCN) with acid, water or protic solvents. All reactions using this reagent should be carried out using the adequate precautions in well ventilated hood.

4.4.1.1. General procedure for the synthesis of imines 3a-e. Imines 3 were synthesized in quantitative yield by refluxing the corresponding aldehydes 2 with anhydrous ethylenediamine (2:1 molar ratio) in absolute ethanol.

4.4.1.2. General procedure for the synthesis of aminonitriles 4a-e. To a solution of the corresponding imine **3** in anhydrous THF, under argon atmosphere and at 0°C, TMSCN was added in a 1:6 molar ratio. The reaction was stirred at room temperature for 20 h, then quenched at 0°C with NH₄Cl (sat. soln.) and extracted with Et₂O (2x100 mL). The combined organic extracts were washed with water and dried over MgSO₄. The solution was filtered and the solvent was removed under vacuum. Aminonitriles **4** were obtained in nearly quantitative yields as highly unstable oils and were hydrolysed immediately after preparation, once their structure was confirmed by ¹H NMR spectroscopy.

Aminonitrile, 4a: Was obtained as a yellow oil from imine **3a**. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 2.68-2.95 (m, 4H), 4.58 (br s, 1H), 4.65 (br s, 1H), 6.73 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.84 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.10-7.23 (m, 4H), 8.25 (s, 1H).

Aminonitrile, 4b: Was obtained as a yellow oil from imine **3b**. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 2.73-2.88 (m, 4H), 4.59 (br s, 2H), 6.70 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H), 7.20 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H).

Aminonitrile, 4c: Was obtained as an orange oil from imine **3c**. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 2.17 (s, 6H), 2.64-2.92 (m, 4H), 4.55 (br s, 1H), 4.60 (br s, 1H), 6.52 (br s, 2H), 6.64 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.03-7.14 (m, 2H).

Aminonitrile, 4d: Was obtained as a yellow oil from imine **3d**. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 2.15 (s, 6H), 2.54-3.01 (m, 4H), 4.56 (br s, 1H), 4.61 (br s, 1H), 6.62 (dd, *J* = 8.2, 3.6 Hz, 2H), 6.96 (dd, *J* = 8.2, 1.9 Hz, 2H), 7.01 (dd, *J* = 3.6, 1.9 Hz, 2H).

Aminonitrile, 4e: Was obtained as a brown oil from imine **3e** and TMSCN (1:3 ratio) after 40h at rt. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 2.73-2.95 (m, 4H), 3.70 (s, 6H), 4.74 (br s, 1H), 4.75 (br s, 1H), 6.76-6.87 (m, 4H), 7.16-7.25 (m, 4H). ¹³C NMR (50.03 MHz, CDCl₃) δ 46.1, 46.4, 49.5, 55.5, 111.1, 118.9, 119.0, 120.8, 123.1, 128.5, 130.3, 156.6

4.4.1.3. General procedure for the synthesis of aminoacids 1a, 1c and 1d.

Concentrated aqueous HCl (12M) was added over the freshly prepared aminonitrile **4** in a 30:1 molar ratio. The mixture was heated at 50-60 °C for 6h and then water was added in a volume equal to the acid. The resultant mixture was refluxed for 6 h. Aminoacids **1** were obtained as a mixture of isomers by precipitation at pH 3 to 4 with 6M NaOH. The solids were filtered, washed successively with H₂O, EtOH and acetone, and finally dried under vacuum.

Ethylenediamine-*N,N*di(2-hydroxyphenyl)acetic acid (EDDHA) **1a**, was obtained as a pale pink solid in 62% yield by precipitation at pH 3. ¹H NMR (200 MHz, (DMSO-*d*₆:TFA) δ 3.06-3.29 (m, 4H), 5.08 (br s, 2H), 6.84-7.00 (m, 4H), 7.24-7.31 (m, 4H). ¹H NMR (200 MHz, D₂O:Na₂CO₃) δ 2.46-2.63 (m, 4H), 4.14 (s, 1H), 4.24 (s, 1H), 6.59-6.65 (m, 4H), 6.89-7.03 (m, 4H). ¹³C NMR (50.03 MHz, (DMSO-*d*₆:TFA) δ 41.4, 58.1, 115.5, 116.8, 123.6, 130.7, 131.2, 155.3, 169.2. IR(KBr) 3410, 3098, 1643 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₁₈H₂₀N₂O₆: C, 59.99; H, 5.59; N, 7.77. Found: C, 59.65; H, 5.48; N, 7.70.

rac-EDDHA and *meso*-EDDHA were obtained using a modification of the method of Bailey et al. (1981). EDDHA (4.5 g) was dissolved in refluxing alcohol (50 mL). Then, a solution of MgCO₃ (1.66 g in 150 mL of water) was added very slowly to the stirred solution of the chelating agent heating continuously. The resulting solution was filtered and Fe(NO₃)₃·9H₂O (4.083 g in 100 mL of water) was added until pH 5. Precipitation was allowed to proceed overnight and the volume was reduced to 200 mL by evaporation. The precipitate (*rac*-EDDHA/Fe³⁺) was filtered after cooling. The filtrate was used to isolate the *meso*-EDDHA.

The resulting *rac*-EDDHA/Fe³⁺ precipitate was purified by refluxing in MeOH (200 mL), removal of the solid phase by filtration and reduction of the volume by evaporation until 25 mL. *rac*-EDDHA/Fe³⁺ was obtained as red crystals. The *meso*-EDDHA/Fe³⁺ isomer was obtained by addition of Fe(NO₃)₃·9H₂O (1.21 g in 20 mL of water) and MgCO₃ (4.15 g) to the filtrate. The resulting solution was evaporated reducing the volume to 50 mL and then was filtered. The filtrate was left to stand to obtain the *meso*-isomer.

meso- and *rac*-EDDHAs can be obtained from their iron complexes by slow addition of KOH solution (1M) over a solution of the complex until massive precipitation of iron oxide was observed. The addition must be done under inert atmosphere in order to avoid undesirable oxidation reactions. The resulting solution was quickly filtered, the pH lowered to 3.7 with HCl, left to stand for 30 minutes and filtered again. The solid phase was washed with deionized water until the solid was colourless. The purity of *rac*- and *meso*-EDDHA was checked by HPLC using the method developed by Lucena et al. (1996). The results shown that the isomer *meso*-EDDHA contained less than 10% of the *racemic* form and the *rac*-EDDHA had less than 1% of the *meso* form.

Ethylenediamine-*N,N*di(2-hidroxy-4-methylphenyl)acetic acid (EDDH4MA) 1c, was obtained as a pale pink solid in a 50% yield by precipitation at pH 3. ^1H NMR (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$:TFA) δ 2.29 (s, 6H), 3.10-3.33 (m, 4H), 5.23 (br s, 2H), 6.75 (m, 2H), 6.83 (br s, 2H), 7.20 (m, 2H). ^1H NMR (200 MHz, D_2O : Na_2CO_3) δ 2.10 (s, 6H), 2.49-2.72 (m, 4H), 4.20 (s, 1H), 4.27 (s, 1H), 6.46-6.53 (m, 4H), 6.83-6.90 (m, 2H). ^{13}C NMR (50.03 MHz, ($\text{DMSO}-d_6$:TFA) δ 20.7, 41.3, 58.3, 116.0, 118.4, 120.1, 130.4, 141.1, 155.6, 169.3. IR(KBr) 3415, 3095, 1618 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6$: C, 61.84; H, 6.23; N, 7.21. Found: C, 61.53; H, 6.47; N, 7.11.

***rac*-EDDH4MA and *meso*-EDDH4MA.** *rac*-EDDH4MA was obtained by precipitation of EDDH4MA at pH 2. The solid was filtered, washed with water, EtOH and acetone and dried. Further purification was achieved by dissolving the solid in 2M HCl and adjusting the solution at pH 1.0 by additions of 6M NaOH. The precipitate was filtered, washed with water, EtOH and acetone and dried. *rac*-EDDH4MA was obtained as a pale pink solid. ^1H NMR (200 MHz, D_2O : NaCO_3) δ 2.09 (s, 6H), 2.55-2.72 (m, 4H), 4.26 (s, 1H), 6.49-6.56 (m, 4H), 6.87-6.91 (m, 2H). ^{13}C NMR (50.03 MHz, ($\text{DMSO}-d_6$: D_2O : NaCO_3) δ 20.4, 44.9, 64.3, 117.7, 119.4, 120.9, 129.4, 139.7, 157.8, 177.7.

meso-EDDH4MA was obtained from the initial filtrate by precipitation at pH 3.5-4.0. The solid was purified as described above. ^1H NMR (200 MHz, D_2O : NaCO_3) δ 2.10 (s, 6H), 2.61 (dd, $J_1 = 9.79$ Hz, $J_2 = 18.17$ Hz, 4H), 4.19 (s, 1H), 6.49-6.52 (m, 4H), 6.86-6.93 (m, 2H). ^{13}C NMR (50.03 MHz, ($\text{DMSO}-d_6$: D_2O : NaCO_3) δ , 20.4, 44.9, 64.3, 117.7, 119.4, 120.9, 129.4, 139.7, 157.8, 177.7.

Ethylenediamine-*N,N*di(2-hidroxy-5-methylphenyl)acetic acid (EDDH5MA) 1d, was obtained as a pale pink solid in a 63% yield by precipitation at pH 4. ^1H NMR (200 MHz, (DMSO- d_6 :TFA) δ 2.26 (s, 6H), 3.10-3.42 (m, 4H), 5.24 (br s, 2H), 6.91 (m, 2H), 7.13 (s, 2H), 7.15 (m, 2H). ^1H NMR (200 MHz, $\text{D}_2\text{O}:\text{Na}_2\text{CO}_3$) δ 2.07 (s, 6H), 2.45-2.73 (m, 4H), 4.15 (s, 1H), 4.24 (s, 1H), 6.56 (d, $J = 8.03$ Hz, 2H), 6.87-6.92 (m, 4H). ^{13}C NMR (50.03 MHz, (DMSO- d_6 :TFA) δ 19.6, 41.7, 58.9, 115.6, 116.6, 128.1, 130.9, 131.8, 153.4, 169.4. IR(KBr) 3418, 3100, 1641 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6$: C, 61.84; H, 6.23; N, 7.21. Found: C, 61.59; H, 6.09; N, 7.09.

4.4.1.4. General procedure for the synthesis of aminoacids 1b and 1e. Acetic formic anhydride freshly prepared by heating an equimolar mixture of Ac_2O and formic acid, at 60°C for 1h was added over neat nitriles **4b** and **4e** at 0°C (Vachal and Jacobsen, 2000; Sigman et al., 2000). The ratio of acetic formic anhydride: nitrile was 15:1. The mixture was stirred at 0°C for 15 min and then poured into a mixture of ice-water, extracted with CH_2Cl_2 (2 x 100 mL) and the organic layers dried over MgSO_4 . The solvent was removed under reduced pressure. The obtained formyl acetonitrile was hydrolyzed without further purification by addition of concentrated HCl (ratio 30:1) and subsequent heating of the mixture $50\text{-}60^\circ\text{C}$ for 2h. The solvent was removed under vacuum and the solid thus obtained, was washed with EtOH and dried. Aminoacids **1b** and **1e** were obtained as hydrochlorides and as a 1:1 mixture of isomers by precipitation.

Ethylenediamine-*N,N*di(4-hydroxyphenyl)acetic acid (*p,p*-EDDHA), 1b was obtained as a pale pink solid in a 20% yield. ^1H NMR (200 MHz, D_2O) δ 2.72-2.07 (m, 4H), 4.67 (s, 1H), 4.68 (s, 1H), 6.55-6.65 (m, 4H), 6.96 (d, $J = 8.73$ Hz, 4H). ^{13}C NMR (50.03 MHz, D_2O) δ 41.6, 63.3, 116.8, 121.5, 130.7, 158.2, 169.7. IR(KBr) 3404, 3323, 3286, 3197, 1697 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_6$: C, 49.90; H, 5.12; N, 6.47. Found: C, 49.55; H, 4.96; N, 6.19.

Ethylenediamine-*N,N*di(2-metoxyphehyl)acetic acid (EDDMtxA), 1e was obtained as a beige solid in 89% yield. ^1H NMR (200 MHz, D_2O) δ 2.94-3.27 (m, 4H), 3.58 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 4.92 (br s, 1H), 5.05 (br s, 1H), 6.90-7.01 (m, 4H), 7.14-7.25 (m, 2H), 7.35-7.49 (m, 2H). ^{13}C NMR (50.03 MHz, D_2O) δ 41.5, 41.6, 55.6, 60.7, 60.9, 112.2,

117.0, 121.6, 131.5, 133.2, 157.2, 157.3, 170.2. IR(KBr) 3328, 3259, 3186, 1735, 1709 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_6$: C, 52.07; H, 5.68; N, 6.07. Found: C, 51.85; H, 5.46; N, 5.79.

4.4.2. Determination of the purity of chelating agents

The solutions of chelating agents were prepared under purified N_2 atmosphere. The ligands were completely dissolved in a volume of 0.200 M NaOH calculated to be four times the molar amount of the ligand, and the pH was fixed at 6 by the addition of 2mM MES buffer [2-(*N*-Morpholino)ethanesulfonic acid]. Ionic strength was adjusted to 0.100 M by addition of NaCl. The concentrations of the chelating agent solutions prepared were low enough (about $1 \cdot 10^{-4}$ M) to comply with Beer's law.

The experimental solution (60 mL) was placed in a 150 mL thermostated jacketed reaction vessel provided with airtight cap fitted with a gas inlet and outlet tubes, combined pH glass electrode, white light spectrophotometer, two piston burettes (tips placed below the surface of the solution) and magnetic stirrer. The photometric titration (carried out at 25.0 ± 0.5 °C) consists on the addition of $4.47 \cdot 10^{-4}$ M Fe^{3+} standard solution to the chelating agent (samples of about $1 \cdot 10^{-4}$ M) until the absorbance at 480 nm presented no changes.

A discussion of the mathematical procedure followed to analyze the obtained data as well as the photometric curves is fully developed in the Supporting Information (see 4.6.1 and Figures 4.4.A and 4.4.B respectively).

Since no iron complexation was observed for the *p,p*-EDDHA and EDDMtxA, their purities were determined by potentiometric titrations with Cu^{2+} ion selective electrode in the same conditions as before. 25 mL of an approximately $1 \cdot 10^{-3}$ M solution of the chelating agents, prepared as before, was titrated with the $4 \cdot 10^{-3}$ M Cu^{2+} standardized solution until constant potential was observed.

4.4.3. Determination of Stability Constants by Potentiometry

Potentiometric titrations were described in detail elsewhere (Martell and Motekaitis, 1992). Titrations of chelating agent solutions were made at 25.0 ± 0.5 °C in a sealed, water-jacked glass vessel, which was maintained under purified N₂ atmosphere. Ionic strength was maintained at 0.100 M with reagent-grade NaCl. Due to the ion solubility of ligands in acid medium, all data were obtained by back-titration with aqueous 0.0500 M HCl standardized titrant. Approximately 10-20 mg of chelating agents were weighted to the nearest 0.01 mg and were dissolved under N₂ atmosphere using four or six equivalents of NaOH (0.200 M). When needed, Ca²⁺ or Mg²⁺ solution were added in ligand:metal (1:1) and (1:10) ratio. The solutions were diluted to a final volume of 50.0 mL. A volume of 25 mL of the experimental solution was back-titrated to pH 2.5 or until precipitation of ligand occurred.

All formation constants, except for the protonation constants corresponding with phenol dissociation, were calculated using the FORTRAN program BEST (Martell and Motekaitis, 1992) described in detail elsewhere (Motekaitis and Martell, 1982).

4.4.4. Determination of Stability constants by Spectrophotometry

Except for EDDMtxA, the first and second protonations occur at pH values where potentiometric measurements become inaccurate. Then, the stability constants were measured spectrophotometrically (L'Eplattenier et al., 1967), since the combination of protons with the phenolic groups are accompanied by extensive changes in the absorption spectra. For each ligand, ten $1 \cdot 10^{-4}$ M solutions were prepared with the ionic strength adjusted at 0.100 M with NaCl and pH adjusted from 10.5 to 13.5 with in 0.3-0.5 pH intervals. 250 - 400 nm spectra were obtained in a Shimadzu UV-VIS spectrophotometer. Wavelength on the maximum absorbances and molar absorptivities of L⁴⁻ and LH₂²⁻ species were initially estimated at pH 13.5 and 10 respectively for each chelating agent (at these pHs the other species are in low concentration) and used as seed for the calculations. The mathematical procedure, spectroscopy equilibrium curves and wavelength chosen for the determination of the first two phenolate protonations are shown in the Supporting Information (see 4.6.2.1, Figure 4.5 and Table 4.7 respectively).

Stability constants for the Fe³⁺ and Cu²⁺ chelates were calculated from spectrophotometric data obtained after base titration. Four or six equivalents of

standard base (0.200 M) were added to the chelating agent and then the ionic strength was maintained at 0.100 M with reagent-grade NaCl. Solutions of iron and copper chelates (1:1 metal:ligand ratio) were prepared under N_2 at $25.0 \pm 0.5^\circ C$, by slow addition of Fe^{3+} or Cu^{2+} standard solutions. When the iron-chelate was formed, hydrochloric acid was added until the solution was colorless (the final pH depends on the chelating agent, sometimes it is as low as pH 1.5-3). The experimental solution was diluted to 500 mL with type I water (ASTM Standards, 1995) to be $1 \cdot 10^{-4}$ M on iron chelate. 25 mL were placed in a 50-mL thermostated jacketed reaction vessel as described previously. For the Fe^{3+} chelate, the experimental solution was titrated with aqueous 0.200 M NaOH titrant to pH 12. The absorbance of the solution was measured at 480 nm at each 0.05-0.1 pH interval, depending of the curve zone.

EDDHA/ Cu^{2+} has been studied in solution by Frost et al. (1958). The same behaviour was obtained when EDDHSA/ Cu^{2+} optical spectra was made, two absorption bands were found, 375 at alkaline pHs and 650 nm at neutral and acid pHs.

For the Cu^{2+} -chelate, the pH was raised until 12 by addition of NaOH. The experimental solution was diluted to 500 mL with type I water (ASTM Standards, 1995) to be $1 \cdot 10^{-3}$ M on copper chelate. 25 mL of the experimental solution, in the same conditions used for the iron complex, were titrated with aqueous 0.200 M HCl titrant until the solution was colorless or precipitation was observed. The absorbance of the solution was measured at 650 nm at 0.05-0.1 pH intervals, depending on the curve zone. The stability constants (K_{FeL} , K_{FeHL} , $K_{Fe(OH)L}$, K_{CuL} , K_{CuHL} and K_{CuH2L}) were calculated from the data by the use of an in-house program using Microsoft Excel Solver® (the Solver options used were already described elsewhere (Maleki et al. 1999) utilizing mass balance and known equilibrium constant constraints (Lindsay, 1979) while minimizing the least-squares absorbance fit to the observed spectral curves.

The mathematical procedure as well as the photometric curves with Fe^{3+} and Cu^{2+} are described in the Supporting Information (see 4.6.2.2 and Figure 4.6, 4.7 and 4.8 respectively).

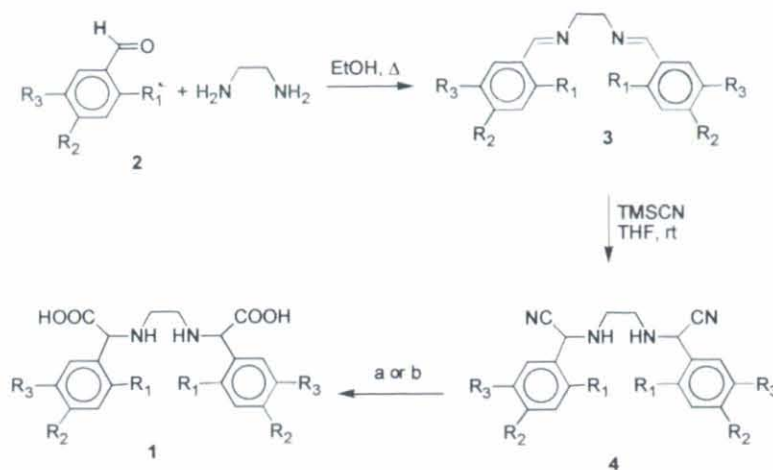
4.4.5. pM values and Species Distribution

A more reliable parameter for ligand effectiveness is the pM value, where $pM = -\log [M]$, which is similar to the "chemical potential" of the aquo metal ion. A comparison of the total sequestering ability of ligands can be made through the determination of pFe and pCu values using two different models. In the first model, the calculation of $[M]$, the concentration of free aquo metal ion was made taking account only the proton affinities of the ligand and other chelate species such as protonated metal complexes, in accordance with Bannochie and Martell (1991) (see 4.6.2.3 in Supporting Information). These values were computed for pH range from 4.0 to 12.0, with strength ionic fixed at 0.100 M, using a 10% excess of ligand. In the second model, pM values, where $pM = -\log(M)$, were calculated in a nutrient solution system in order to know the total sequestering ability of iron chelates in agronomic conditions. For this, both component and thermodynamic databases of the equilibrium speciation model MINTEQA2 program were modified in order to include each ligand and their formation constants (as activity constants) (Allison et al. 1990). Each ligand was introduced as iron chelate in the Hoagland nutrient solution, which composition was; $Fe^{3+} = \text{Ligand} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $Cu^{2+} = 3.15 \cdot 10^{-7} \text{ M}$; $Ca^{2+} = 1.6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $Mg^{2+} = 8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. pFe values were calculated at 4-12 pH range.

The distribution of species was determined by means of theoretical models considering the conditions in which they are applied. With this aim a model was employed to know the behaviour of the chelating agents in solution at 4-13 pH range. Species distribution was established using the same methodology than that used to calculate pFe in agronomic conditions.

4.5. RESULTS AND DISCUSSION

The synthesis of ligands **1** was done starting from the corresponding aldehydes **2** by condensation with ethylenediamine in boiling absolute EtOH. The diimines **3**, were obtained either as pure compounds from the reaction medium or recrystallized from EtOH. Imines **3** were reacted with TMSCN in anhydrous THF at rt to yield the corresponding α -aminonitriles **4**. The presence of an *o*-hydroxy group in the aromatic ring made compounds **4a**, **4c** and **4d** highly reactive, and they were submitted to acid hydrolysis without further purification by sequential treatment with concentrated HCl and diluted HCl (Scheme 4.2). In contrast, α -aminonitriles **4b** and **4e** lacking an *o*-hydroxy group were considerably more stable but gave retrocondensation products when



1a (62%) $\text{R}_1 = \text{OH}; \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{H}$
1b (20%) $\text{R}_1 = \text{H}; \text{R}_2 = \text{OH}; \text{R}_3 = \text{H}$
1c (50%) $\text{R}_1 = \text{OH}; \text{R}_2 = \text{Me}; \text{R}_3 = \text{H}$
1d (63%) $\text{R}_1 = \text{OH}; \text{R}_2 = \text{H}; \text{R}_3 = \text{Me}$
1e (89%) $\text{R}_1 = \text{OMe}; \text{R}_2 = \text{H}; \text{R}_3 = \text{H}$

1a, c, d method a: 1) HClcc ; 2) $\text{HCl/H}_2\text{O}$
1b, e method b: 1) $\text{HCOOH/Ac}_2\text{O}$; 2) HClcc

Scheme 4.2. Synthesis of *o,o'*-EDDHA (Sierra et al. 2002)

obtained by precipitation from the reaction mixture, by adjusting the solution to pH 3 with NaOH 6M. Amino acids **1b** and **1e** were obtained as their hydrochlorides. Compounds **1** were isolated as a 1:1 mixture of diastereomers in all cases and their analytical and spectroscopic data were consistent with the proposed structures. The purity of the chelating agents synthesized was higher than 90% by ^1H NMR.

The NMR has been frequently used to determine the purity of the free chelating agents (Bannochie and Martell 1989, 1991). However, despite its accuracy, inorganic impurities and water contents cannot be evaluated by this technique. The titrimetric purity (Ryskiewich and Boka, 1962; Hill-Cottingham, 1957) is an alternative technique to determine the purity of ligands like EDDHA and their analogues.

The titrimetric purity of the chelating agents **1a-f**, determined by photometry (with Fe^{3+}) or potentiometry (with Cu^{2+}), was higher than 87% in all cases, which is in good agreement with the estimated purity obtained by ^1H NMR (considering that the error of this technique is $\pm 4\%$). The molar absorptivities of all the Fe^{3+} chelates are of the same order of magnitude, as both phenolate groups are coordinated to Fe^{3+} (see

they were hydrolyzed in concentrated HCl. To avoid this undesirable reaction, the hydrolysis of nitriles **4b** and **4e** was made by previous formylation of the amino groups in the nitriles ($\text{HCOOH/Ac}_2\text{O}$)

followed by acid hydrolysis (Vachal and Jacobsen, 2000; Sigman et al., 2000).

The pure amino acids **1a**, **1c** and **1d** were

Table 4.8 in Supporting Information). The molar absorptivities of p,p -EDDHA/ Fe^{3+} and EDDMtxA/ Fe^{3+} could not be determined as the formation of these iron chelates is not possible. For this reason, the purities of ligands **1b** and **1e** were determined using the potentiometric method with Cu^{2+} solution.

4.5.1. Protonation Constants

As stated above, except for p,p -EDDHA **1b** and EDDHSA **1f**, the spectrophotometric constants K_1^H and K_2^H were used as seed, and then refined together with the protonation constants (that were determined by potentiometric methods) using the program BEST (Martell and Motekaitis, 1992). The protonation constants for ligands **1a-f** are shown in Table 4.1. Exception made of EDDMtxA that bears two methoxy groups all the chelating agents tested are hexadentate, having two phenolates, two nitrogens, and two carboxylates (Serratice et al., 2001).

The two highest protonation constants of EDDHSA are considerably lower than those of EDDHA and EDDH4MA (Table 4.1). A similar trend is observed for the dissociation constants of p -hydroxybenzenesulfonic acid ($\text{p}K_a = 8.82$), phenol ($\text{p}K_a = 10.00$) and 3-methylphenol ($\text{p}K_a = 10.09$). Significantly, the magnitude of K_1^H and K_2^H for p,p -EDDHA is lower than in the case of EDDHA. This is probably due to the stabilization of the σ -hydroxyphenyl glycine moiety in EDDHA by formation of a hydrogen bond between the basic nitrogen atom and the phenolic group. This interaction is not possible in p,p -EDDHA, making the K^H values closer to the $\text{p}K_a$ of phenol.

K_3^H and K_4^H correspond to the protonation constants of the secondary amine nitrogens, and K_5^H and K_6^H , to the protonation of the carboxylate oxygens. Bannochie and Martell (1989) related the impossibility of getting the protonation constants of the carboxylate oxygens because of the precipitation caused by the addition of the fourth equivalent of acid in the back-titration. However in a later work (Bannochie and Martell, 1991), these authors considered that although the precipitation occurs, it is possible to titrate a supersaturated solution of these ligands quickly beyond this point. In this work K_5^H and K_6^H are only determined for EDDHSA due to its higher solubility.

Table 4.1. log Protonation Constants^a for the chelating agents 1. (The reference values are given in brackets).

Constants Quotient	K_1^H [HL]/ [H][L]	K_2^H [H ₂ L]/ [H][HL]	K_3^H [H ₃ L]/ [H][H ₂ L]	K_4^H [H ₄ L]/ [H][H ₃ L]	K_5^H [H ₅ L]/ [H][H ₃ L]	K_6^H [H ₆ L]/ [H][H ₃ L]
EDDHA	11.94 (11.68) ^b	10.73 (10.24) ^b	8.66 ± 0.04 (8.64) ^b	6.18 ± 0.06 (6.32) ^b		
<i>rac</i> -EDDHA	11.88 (12.05) ^c	10.80 (10.87) ^c	8.67 ± 0.01 (8.79) ^c	6.28 ± 0.11 (6.33) ^c		
<i>meso</i> -EDDHA	11.90 (11.90) ^c	10.89 (10.85) ^c	8.58 ± 0.04 (8.76) ^c	6.16 ± 0.02 (6.36) ^c		
<i>p,p</i> -EDDHA	9.94 ± 0.04	9.07 ± 0.02	6.85 ± 0.06	4.36 ± 0.07		
EDDH4MA	11.63	10.48	8.73 ± 0.01	6.40 ± 0.13		
<i>rac</i> -EDDH4MA	11.83 (11.53) ^d	10.71 (10.79) ^d	8.58 ± 0.15 (8.95) ^d	6.17 ± 0.03 (nd) ^d		
<i>meso</i> -EDDH4MA	11.97 (11.46) ^d	10.75 (10.75) ^d	8.72 ± 0.13 (9.11) ^d	6.35 ± 0.02 (6.63) ^d		
EDDH5MA	11.89	10.78	8.71 ± 0.11	6.55 ± 0.13		
EDDMtxA			7.61 ± 0.09*	4.92 ± 0.47*		
EDDHSA	10.43 ± 0.08	8.90 ± 0.03	7.45 ± 0.04	5.90 ± 0.06	2.63 ± 0.09	1.93 ± 0.16

^aThis work; μ = 0.1 M (NaCl); t = 25 °C. ^bFrost et al. (1958); μ = 0.1 M (KNO₃); t = 25 °C.^cBannochie and Martell (1989); μ = 0.1 M (KCl); t = 25 °C. ^dAhrland et al. (1990); μ = 1.0 M (NaCl); t = 25 °C*Although these protonation constants correspond to K_1^H and K_2^H , they are showed as K_3^H and K_4^H respectively as they involve the protonation of the secondary nitrogens.

The protonation constants obtained for EDDHA and their isomers have comparable values and are very similar to those already published by Bannochie and Martell (1989). However, the magnitude of our K_1^H and K_2^H for EDDHA is higher than those reported by Frost et al. (1958), since he used a potentiometric method that was limited at pH over 11. The methyl group in the benzene ring could slightly increase the basicity of the phenol (phenol, $pK_a = 10.00$; 3-methylphenol, $pK_a = 10.09$; 4-methylphenol, $pK_a = 10.26$). The effect of the sulfonic groups in increasing the acidity of the phenolic groups is reflected in the values of all the protonation constants of EDDHSA

4.5.2. Ca^{2+} and Mg^{2+} Stability Constants

Ca^{2+} and Mg^{2+} stability constants for ligands 1a-g are shown in Table 4.2. From the Ca^{2+} and Mg^{2+} potentiometric curves, it may be presumed the existence of at least three species of the metal chelates: MH_2L , MHL^- and ML^{2-} . The magnitudes of Mg^{2+} stability constants are higher than those of Ca^{2+} for all the products. This behavior is the opposite to that found for other hexadentate ligands like ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), (diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), *trans*-1,2-cyclohexylenedinitrilotetraacetic acid (CDTA), *N*-(hydroxyethyl)-ethylenediamine-*N,N*-triacetic acid (HEDTA) and ethyleneglycoldi(ethylamine)tetraacetic acid (EGTA) (Lindsay 1979), although but it can be easily explained by considering both, ligand architecture and metal properties (size of the metal, charge, ionic radius and so on). Both Ca^{2+} and Mg^{2+} have been classified as hard acids, according to the HSAB Principle of Pearson et al. (1963), but the ionic radius of Mg^{2+} (0.7 Å) is smaller than that of Ca^{2+} (1.0 Å). As a conclusion, Mg^{2+} can form chelates more effectively than the larger Ca^{2+} with this type of phenolic ligands (Hancock and Martell, 1989). This phenomenon has also been observed for other phenolic ligands (e.g. *N,N*-di(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-*N,N*-diacetic acid, HBED) (L'Eplattenier et al. 1967). In general, the presence of methyl and sulphonate substituents in the benzene ring has little effect on the Ca^{2+} and Mg^{2+} stability constants. Again, the lowest values correspond to *p,p*-EDDHA and EDDMtxA that have the phenolate groups unavailable for coordination with the metals.

Table 4.2. log Stability constants for Ca^{2+} and Mg^{2+} Chelates of ligands 1.

Element Quotient	Ca^{2+}			Mg^{2+}		
	$\frac{[\text{ML}]}{[\text{L}][\text{M}]}$	$\frac{[\text{MHL}]}{[\text{H}][\text{L}][\text{M}]}$	$\frac{[\text{MH}_2\text{L}]}{[\text{H}]^2[\text{L}][\text{M}]}$	$\frac{[\text{ML}]}{[\text{L}][\text{M}]}$	$\frac{[\text{MHL}]}{[\text{H}][\text{L}][\text{M}]}$	$\frac{[\text{MH}_2\text{L}]}{[\text{H}]^2[\text{L}][\text{M}]}$
EDDHA	7.29 ± 0.30	16.77 ± 0.33	25.95 ± 0.50	9.76 ± 0.05	18.18 ± 0.15	25.36 ± 0.24
<i>rac</i> -EDDHA	7.99 ± 0.42	17.42 ± 0.39	26.87 ± 0.37	10.13 ± 0.03	nd	nd
<i>meso</i> -EDDHA	7.56 ± 0.49	17.10 ± 0.65	26.41 ± 0.64	9.44 ± 0.08	17.51 ± 0.25	26.56 ± 0.35
<i>p,p</i> -EDDHA	3.54 ± 0.52	12.93 ± 0.58	21.21 ± 0.65	3.74 ± 0.57	12.89 ± 0.39	20.79 ± 0.57
EDDH4MA	5.84 ± 0.28	15.86 ± 0.07	24.58 ± 0.17	8.00 ± 0.02	17.06 ± 0.15	24.81 ± 0.06
<i>rac</i> -EDDH4MA	7.18 ± 0.11	16.66 ± 0.36	26.31 ± 0.44	7.82 ± 0.18	17.01 ± 0.11	25.42 ± 0.34
<i>meso</i> -EDDH4MA	6.85 ± 0.24	16.89 ± 0.63	26.31 ± 0.73	9.65 ± 0.11	17.88 ± 0.05	26.33 ± 0.10
EDDH5MA	6.65 ± 0.57	16.76 ± 0.58	26.22 ± 0.78	7.83 ± 0.08	16.88 ± 0.10	25.28 ± 0.37
EDDMtxA	3.19 ± 0.40	10.64 ± 0.38	nd	3.93 ± 0.49	10.87 ± 0.39	nd
EDDHSA	5.40 ± 0.07	13.15 ± 0.27	21.75 ± 0.21	6.95 ± 0.12	14.29 ± 0.07	21.44 ± 0.13

^a $\mu = 0.1 \text{ M (NaCl)}$; $t = 25^\circ\text{C}$

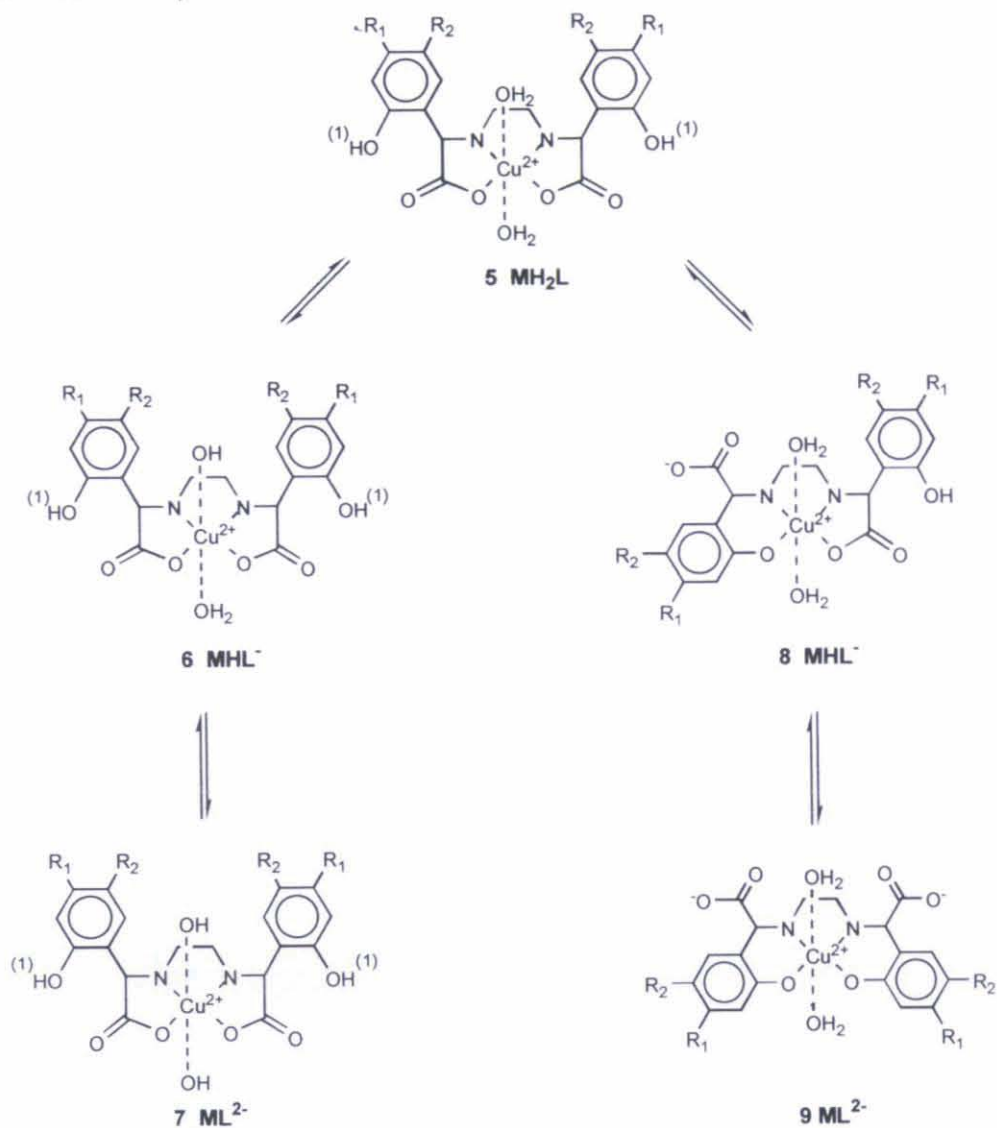
4.5.3. Fe^{2+} and Cu^{2+} Stability Constants

For each ligand **1** the Cu^{2+} and Fe^{2+} stability constants showed in Table 4.3 were determined from plots of absorbance against pH at 480 nm for iron and at 650 nm for copper. The observed values for EDDHA (and their *racemic* and *meso*-forms) are in good agreement with those previously reported (Bannochie and Martell, 1989). This fact validates the spectrophotometric methodologies proposed and developed through this work. Therefore, spectrophotometric titrations can be used to determine Cu^{2+} and Fe^{3+} stability constants with phenolic ligands. Additionally, this methodology could be applied to determine any metal-ligand affinity if the formation of a chelate can be measured photometrically (Frost et al. 1958; Bannochie and Martell 1989; L'Eplattenier et al. 1967; Bannochie and Martell 1991).

Table 4.3. log Stability constants^a for Cu²⁺ and Fe³⁺ Chelates of ligands 1. The reference values are given in brackets

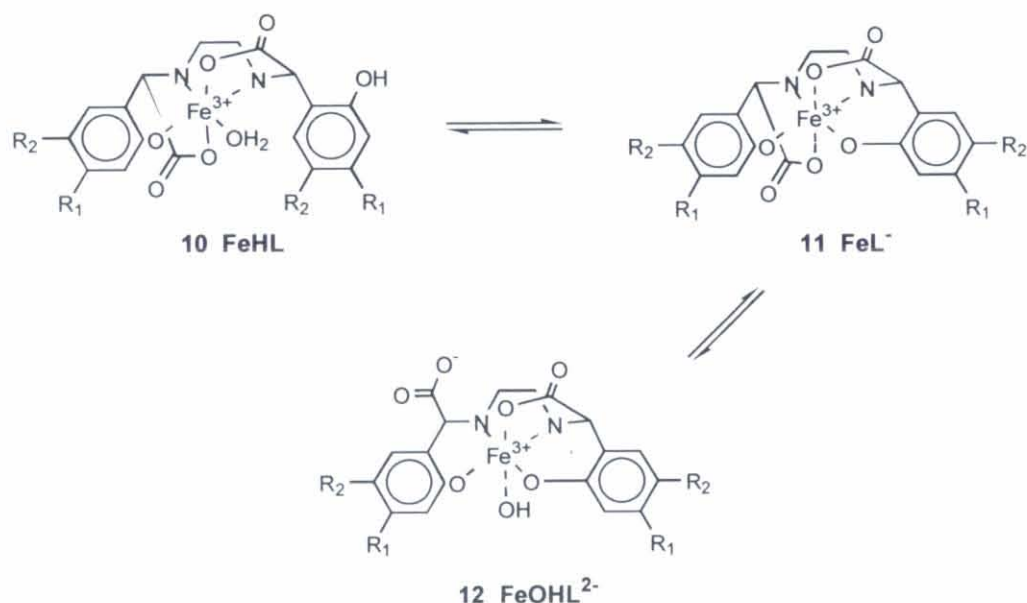
Element	Cu ²⁺				Fe ³⁺			
Quotient	[ML]/ [L] [M]	[MHL]/ [H][L] [M]	[MH ₂ L]/ [H] ² [L] [M]	[MH ₃ L]/ [H] ³ [L] [M]	[ML]/ [L] [M]	[MHL]/ [H][L] [M]	[MH ₂ L]/ [H] ² [L] [M]	[MOHL]/ [H] ⁻¹ [L] [M]
EDDHA	25.13 ± 0.00 (23.90) ^c	32.61 ± 0.01 (31.94) ^b	37.31 ± 0.01 (36.92) ^b		35.09 ± 0.28 (33.91) ^d	36.89 ± 0.21		23.66 ± 0.27
<i>rac</i> -EDDHA	24.94 ± 0.05 (25.27) ^b	32.87 ± 0.04 (32.99) ^b	37.33 ± 0.07 (37.43) ^b		35.86 (35.54) ^b	35.08		13.12 (23.76) ^b
<i>meso</i> -EDDHA	23.68 ± 0.02 (23.68) ^b	32.30 ± 0.00 (32.05) ^b	37.25 ± 0.01 (37.19) ^b		34.15 (33.28) ^b	36.56 (36.00) ^b		22.81 (22.83) ^b
<i>p,p</i> -EDDHA	14.74 ± 0.06	22.39 ± 0.06	28.50 ± 0.04	31.09 ± 0.04				
EDDH4MA	23.94 ± 0.03	31.06 ± 0.01	36.07 ± 0.01		34.44 ± 0.06	36.59 ± 0.07		22.81 ± 0.13
<i>rac</i> -EDDH4MA	22.67 ± 0.07	31.49 ± 0.02	36.62 ± 0.03		33.75 ± 0.05 (37.9) ^e	36.31 ± 0.05 (40.4) ^e		22.34 ± 0.05 (26.04) ^e
<i>meso</i> -EDDH4MA	24.47 ± 0.05	32.38 ± 0.05	37.21 ± 0.01		35.54 ± 0.07 (39.0) ^e	36.85 ± 0.03 (40.9) ^e		23.45 ± 0.17 (25.55) ^e
EDDH5MA	23.46 ± 0.02	32.21 ± 0.01	37.36 ± 0.01		33.66 ± 0.01	36.41 ± 0.10		21.98 ± 0.01
EDDMtxA	15.73 ± 0.12	23.65 ± 0.12	29.91 ± 0.19	32.38 ± 0.19				
EDDHSA	21.62 ± 0.29	29.61 ± 0.19	33.99 ± 0.12	35.48 ± 0.19	32.79 ± 0.16	34.63 ± 0.17	36.15 ± 0.18	21.91 ± 0.17

^aμ = 0.1 M (NaCl); t = 25 °C.^bBannochie and Martell (1989); μ = 0.1 M (KCl); t = 25 °C.^cL'Eplattenier et al. 1967; μ = 0.1 M (KCl); t = 25 °C^dL'Eplattenier et al. 1967; μ = 0.1 M (KNO₃); t = 20 °C. ^eAhrland et al. (1990); μ = 1.0 M (NaCl); t = 25 °C

Scheme 4.3. Cu^{2+} species formed


	Ligand	R_1	R_2	(1)
1a	EDDHA	H	H	
1b	<i>p,p</i> -EDDHA	OH	H	H
1c	EDDH4MA	CH_3	H	
1d	EDDH5MA	H	CH_3	
1e	EDDMtxA	H	H	OCH_3
1f	EDDHSA	H	SO_3H	
1g	EDDCHA	H	COOH	

The different Cu^{2+} chelate species are represented in Scheme 4.3. At neutral pH or below, a typical blue Cu^{2+} complex is observed, which no doubt involves only coordination to the ethylenediamine nitrogens, the carboxylate oxygens and two molecules of water (5 in Scheme 3) (Patch et al. 1982). For *p,p*-EDDHA and EDDMtxA these are the only possible ways of binding Cu^{2+} due to the absence of the *ortho*-hydroxy groups. Consequently, their solutions remain blue until pH 12. Furthermore, for these chelating agents, the other Cu^{2+} stability constants must involve exclusively the water molecules binding the metal (see 6 and 7 in Scheme 4.3). For the rest of chelating agents a new green complex is formed as the pH rises. This complex involves coordination of the Cu^{2+} by the phenol groups (9 in Scheme 4.3). Finally, species 8 appear at intermediate pH values and involve the two amino groups, one carboxylate group and one phenolate group.



Ligand	R ₁	R ₂
1a EDDHA	H	H
1b <i>p,p</i> -EDDHA	OH	H
1c EDDH4MA	CH ₃	H
1d EDDH5MA	H	CH ₃
1e EDDMtxA	H	H
1f EDDHSA	H	SO ₃ H
1g EDDCHA	H	COOH

Scheme 4.4. Fe^{3+} species formed

The Fe^{3+} chelate species are represented in Scheme 4.4. The predominant species involves the coordination with the nitrogen atoms, the carboxylate oxygens and the phenolate groups (11 in Scheme 4.4) except for *p,p*-EDDHA and EDDMtxA that are not able to form the chelate. The protonated (10) and hydroxylated (12) species are predominant at pH below 3 and above 10 respectively.

The differences in stability between iron and copper complexes of both isomers of EDDHA have been explained by a geometric selectivity effect (Bannochie and Martell 1989). However, it is not yet clearly understood why Cu^{2+} and Fe^{3+} -*meso*-EDDH4MA complexes are more stable than those obtained from *rac*-EDDH4MA.

4.5.4. pM values and Species Distribution

pFe and pCu values were determined using the first model (see the Experimental Section) in a 4-12 pH range. Tables 4.4 and 4.5 only show the pM values at agronomic pH values.

Table 4.4. pFe^a against pH for Iron chelates.^b

Ligand	7	7.5	8	8.5
EDDHA	23.7	25.2	26.7	28.0
<i>rac</i> -EDDHA	24.4	26.0	27.4	28.8
<i>meso</i> -EDDHA	22.7	24.2	25.7	27.0
EDDH4MA	23.5	25.0	26.5	27.9
<i>rac</i> -EDDH4MA	22.6	24.1	25.5	26.9
<i>meso</i> -EDDH4MA	24.0	25.5	27.0	28.4
EDDH5MA	22.1	23.7	25.2	26.6
EDDHSA	25.9	27.2	28.3	29.3

^aCalculated for $[\text{Lt}] = 1.1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $[\text{Mt}] = 1.0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

^b For pFe data in the whole pH range see Table 4.9 in Supporting Information

The pFe values obtained for all the phenolic ligands 1b-f in Table 4.4 are comparable in magnitude with the pFes of EDDHA and hence of them could be applied into soil system as iron chlorosis correctors. EDDHSA, *rac*-EDDHA and *meso*-EDDH4MA

are the most effective ligands for binding Fe^{3+} . On the other hand, EDDH5MA is the weakest ligand in all pH range.

Table 4.5. pCu^a against pH for copper chelates.^b

Ligand	7	7.5	8	8.5
EDDHA	14.3	15.5	16.8	18.1
<i>rac</i> -EDDHA	14.5	15.6	16.8	18.0
<i>meso</i> -EDDHA	13.9	14.9	15.9	16.9
EDDH4MA	13.4	14.7	16.1	17.4
<i>rac</i> -EDDH4MA	13.3	14.3	15.3	16.3
<i>meso</i> -EDDH4MA	13.9	15.0	16.2	17.4
EDDH5MA	13.7	14.8	15.8	16.8
EDDHSA	15.7	16.6	17.4	18.2
<i>p,p</i> -EDDHA	9.2	9.9	10.7	11.6
EDDMtxA	15.1	14.9	14.8	14.8

^aCalculated for $[\text{L}^+] = 1.1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $[\text{M}^+] = 1.0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

^b For pCu data in the whole pH range see Table 4.10 in Supporting Information

The pCu values are shown in Table 4.5. The pCu for all the phenolic ligands, (except for *p,p*-EDDHA and EDDMtxA) are comparable in magnitude. EDDHSA is the most effective at pH below 9. On the other hand, *p,p*-EDDHA has the lowest pCu values in all pH range, since the phenolic groups cannot bind copper. pCu values from EDDMtxA vary slightly with pH showing the highest values in acid pH. The relative behavior of EDDHSA respect to EDDHA, is similar to that of SHBED respect to HBED (Motekaitis et al. 1989; Clark and Martell, 1988). The greater acidity provided by the sulphonic groups results in ligands that are more effective at lower pH values. Additionally, as was indicated by the values of the protonation constants, the competition among metal and protons is higher in EDDHA than in EDDHSA, therefore EDDHSA is more effective than EDDHA for Fe^{3+} chelation. pFe and pCu trends for the isomers of EDDHA and EDDH4MA, correspond with their stability constants. *rac*-EDDHA and *meso*-EDDH4MA are more effective in binding metals than *meso*-EDDHA and *rac*-EDDH4MA respectively.

4. Chelating agents related to EDDHA

pFe and pCu are very useful to compare effectiveness of these ligands when applied in solution containing only one metal. However in physiological studies and agronomic use, the iron chelates are used in systems where several other metals (i.e. Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , etc) are present. The presence of those metals can modify the relative effectiveness of the iron chelates and, therefore, the pFe values could vary.

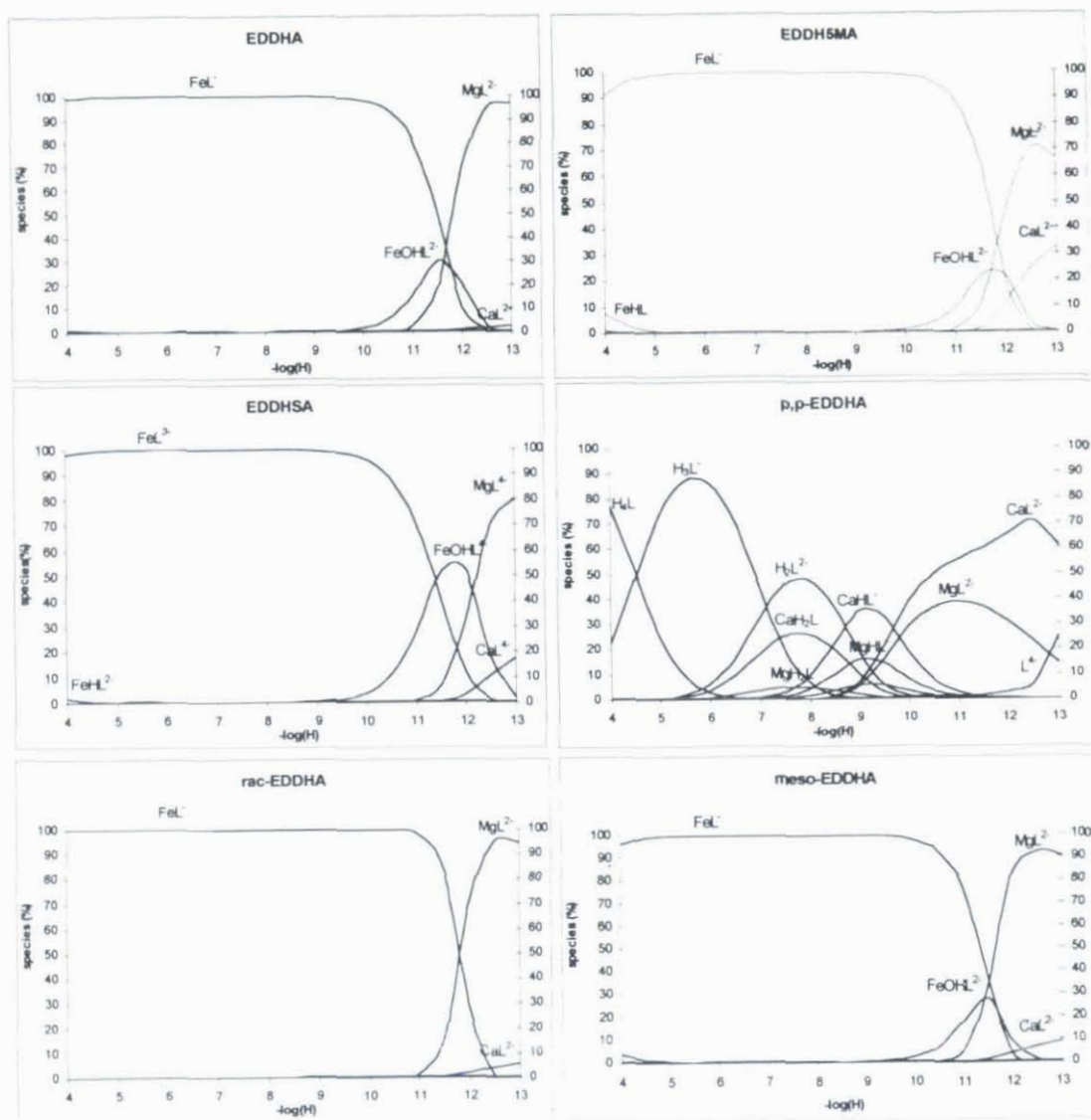
Table 4.6. pFe values against pH in agronomic conditions

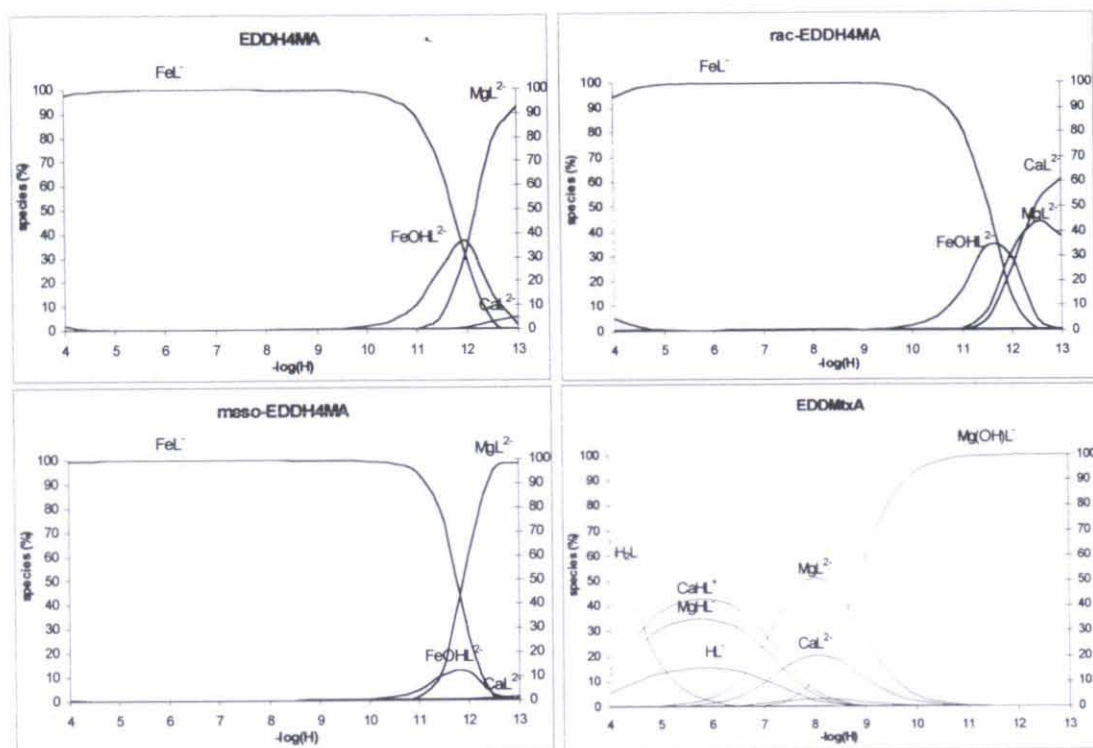
Ligand	7	7.5	8	8.5
EDDHA	15.09	16.28	17.67	19.27
<i>rac</i> -EDDHA	15.20	16.40	17.79	19.34
<i>meso</i> -EDDHA	15.03	16.24	17.65	19.27
EDDH4MA	15.28	16.43	17.77	19.31
<i>rac</i> -EDDH4MA	15.07	16.27	17.69	19.30
<i>meso</i> -EDDH4MA	15.25	16.44	17.83	19.36
EDDH5MA	15.02	16.22	17.63	19.26
EDDHSA	15.26	16.46	17.86	19.41

$^{\circ}(\text{Fe}^{3+}) = (\text{Ligand}) = 1.0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $(\text{Ca}^{2+}) = 1.6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $(\text{Mg}^{2+}) = 8.0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $(\text{Cu}^{2+}) = 3.15 \cdot 10^{-7} \text{ M}$.

For this reason and as example, in the second model the pFe values were also obtained for chelating agents in a nutrient solution system (Table 4.6). These pFe values are lower than those of pFe presented in Table 4.4 for single metal chelation, due to the competition between iron and the other metals. In general, all phenolic chelating agents considered present similar pFe values in nutrient solution conditions and they can be used as chlorosis correctors. Therefore, in order to determine their effectiveness, their behavior will depend on other external factors as soil properties, way of application, culture type, meteorological conditions, solubility and so on.

Figure 4.3. Species distribution against pH using Hoagland nutrient solution composition. (Fe^{3+}) = (Ligand) = $1.0 \cdot 10^{-4}$; (Ca^{2+}) = $1.6 \cdot 10^{-3}$; (Mg^{2+}) = $8.0 \cdot 10^{-4}$; (Cu^{2+}) = $3.15 \cdot 10^{-7}$. For the plots of the remaining chelating agents see the Supporting Information.





In Figure 4.3 the species distribution curves for the chelating agents in Hoagland nutrient solution are shown. For all phenolic ligands (exception made of *p,p*-EDDHA and EDDMtxA) the FeL^- species is the predominant in the whole physiological pH range. Thus, the 100% of the iron chelate remains as FeL^- species at pH below 11. The hydroxylated FeOH^{2-} species appear at pH around 11.5 in those ligands in which it has been possible to determine it. Only at pH above 11.5, the calcium and magnesium chelates become predominant species. Due to the low concentration of Cu^{2+} in Hoagland nutrient solution, copper chelates are not predominant in either pH range, although their stability constants are higher than those of Ca^{2+} and Mg^{2+} that are present in larger concentration. The curves are in good agreement with the pFe values, because all phenolic ligands are able to form very stable iron chelates.

4.6. CONCLUSIONS

The proposed methodology involving analytical determinations (titrimetric purity, protonation and stability constants, pM) and speciation distribution in agronomic

conditions has been developed and applied to phenolic ligands used as fertilizers. The ligands studied through this work have been obtained by means of a new general synthetic methodology. As the procedure allows the synthesis of the chelating as pure compounds, these ligands can be used as standards to identify and quantify commercial chelates (EDDHA, EDDH4MA and their geometric isomers) as well as to detect the presence of undesirable compounds in fertilizers of general use (EDDH5MA and *p,p*-EDDHA). The results obtained in this work indicate that EDDHA and their analogues (EDDH4MA, EDDH5MA and EDDHSA) present comparable chelating ability, measured through divalent and trivalent metal affinities together with pFe and pCu values.

4.7. SUPPORTING INFORMATION

Equations related to the determination of purity of the chelating agents, spectrophotometric measurements for protonation constants and Fe³⁺ and Cu²⁺ stability constants and pM determination, including figures and tables. This material is available free of charge via Internet at <http://www.pubs.acs.org>.

4.7.1. Determination of the purity of chelating agents by photometric titrations

The typical plot of corrected absorbance versus volume of titrant shows two linear segments in which the intersection end point volume is considered. The corrected absorbance can be expressed as:

$$A_{corrected} = \frac{(V + V_{Fe} + V_{NaOH})}{V} A_{measured} \quad (1)$$

where V is the initial volume, V_{Fe} is the volume of titrant added and V_{NaOH} is the volume of 0.200 M NaOH used to maintain the pH 6 during the titration.

Considering that the stoichiometry of the iron complex is 1:1, the purity of the chelating agents can be determined by Eq. 2.

$$Purity(\%) = \frac{M_{Fe} \cdot EP \cdot 100 \cdot P}{m \cdot V} \quad (2)$$

where M_{Fe} is the molar concentration of the iron standard solution standardized by atomic absorption spectroscopy, EP is the end point titration volume (L), P is the amount (g) of chelating agent used, m is the molecular weight of the chelating agent and V is the initial volume. Molar absorptivities for the iron chelates were also determined at 480 nm.

4.7.2. Spectrophotometric Equilibrium Measurements

4.7.2.1 Protonation Constants

The protonation constants and molar absorptivities for the phenolic protons (first and second association constants) were determined with a in-house fitting program using Solver tool of Excel®. The program varies the unknown molar absorptivities and log protonation constants to achieve the best possible fit between the observed and calculated absorbances $[\sum (A_{\text{experimental}} - A_{\text{calculated}})^2]$. Calculated absorbance is determined using the Eq. 3 and 4.

$$A = \sum_0^2 \varepsilon_{H_p L} [H_p L] \quad (3)$$

$$L_t = \sum_0^2 [H_p L] = \sum_0^2 K_p^H (H^+)^p [L^{4-}] \quad (4)$$

K_1^H , K_2^H and molar absorptivities are determined at the wavelength on the maximum at a series of pH values, (5)-(7)

$$A = \varepsilon_L [L^{4-}] + \varepsilon_{HL} [HL^{3-}] + \varepsilon_{H_2L} [H_2L^{2-}] = [L^{4-}] \cdot (\varepsilon_L + \varepsilon_{HL} K_1^H (H^+) + \varepsilon_{H_2L} \cdot K_2^H K_1^H (H^+)^2) \quad (5)$$

$$\begin{aligned} L_t &= [L^{4-}] + [HL^{3-}] + [H_2L^{2-}] = [L^{4-}] + K_1^H (H^+) [L^{4-}] + K_2^H K_1^H (H^+)^2 [L^{4-}] = \\ &= [L^{4-}] \cdot (1 + K_1^H (H^+) + K_2^H K_1^H (H^+)^2) \end{aligned} \quad (6)$$

Dividing Eq. 5 and Eq. 6 and eliminating $[L^{4-}]$, one gets

$$A = L_t \cdot \frac{\varepsilon_L + \varepsilon_{HL} K_1^H (H^+) + \varepsilon_{H_2L} K_2^H K_1^H (H^+)^2}{1 + K_1^H (H^+) + K_2^H K_1^H (H^+)^2} \quad (7)$$

The spectroscopic equilibrium curves used in the determination of K_1^H and K_2^H are presented in Figure 4.5. A plot of absorbance versus p(H) (Figure 4.5.A) for the chelating agents reveals an smoothed line due to the overlapping nature of the first and second protonation constants. The in-house program varies the unknown molar absorptivities and log protonation constants to achieve the best possible fit between the observed and calculated absorbances (Figure 4.5.B).

The wavelength at which the deprotonated species presents its maximum is shown in Table 4.7. This absorption band has been considered for the determination of the first two phenolate protonations for each ligand, K_1^H and K_2^H , also in table 4.7 the molar absorptivities for the species involved are presented.

4.7.2.2. Fe^{3+} and Cu^{2+} Stability Constants

In both Fe^{3+} and Cu^{2+} systems, mass balance and known equilibrium constants were used in order to determine the calculated absorbance where $M = Fe$ and Cu and $L =$ ligands (Eq. 8).

$$A = \sum_{n=-1}^{n=1} [MH_n L] \cdot \varepsilon_{MH_n L} \quad (8)$$

where $\sum [MH_n L] \cdot \varepsilon_{MH_n L} = [FeL] \cdot \varepsilon_{FeL} + [FeHL] \cdot \varepsilon_{FeHL} + [FeH_2L] \cdot \varepsilon_{FeH_2L} + [FeOHL] \cdot \varepsilon_{FeOHL}$
for the Fe(III) system and
 $\sum [MH_n L] \cdot \varepsilon_{MH_n L} = [CuL] \cdot \varepsilon_{CuL} + [CuHL] \cdot \varepsilon_{CuHL} + [CuH_2L] \cdot \varepsilon_{CuH_2L} + [CuH_3L] \cdot \varepsilon_{CuH_3L}$
for the Cu(II) system.

The molar concentrations of the species can be calculated from the equilibrium constants and mass balances (Eqs. 9-10)

$$L_t = \sum_{n=0}^{n=6} [H_n L] + \sum_{n=-1}^{n=0} [MH_n L] \quad (9)$$

$$M_t = \sum_{n=-4}^{n=0} [MH_n] + \sum_{n=-1}^{n=1} [MH_n L] \quad (10)$$

where the term $[H_n L]$ includes all ligand species in function of their overall protonation constants, determined previously. The term $[MH_n]$ includes Fe^{3+} and Cu^{2+} hydroxylated species that can be important in some pH range and can compete for the metal with the chelates.

According to Lindsay (1979) the hydroxylated species to be considered are $Fe(OH)^{2+}$, $Fe(OH)_2^+$, $Fe(OH)_3^0$ and $Fe(OH)_4^-$ for Fe^{3+} complexes and $Cu(OH)^+$, $Cu(OH)_2^0$, $Cu(OH)_3^-$ and $Cu(OH)_4^{2-}$ for Cu^{2+} complexes. Fe^{3+} and Cu^{2+} hydroxylated species are introduced with their respective constants (Lindsay (1979). Therefore Eqs. 9 and 10 can be expressed as free ligand (L^{n-}) and free metal (M^{n+}) Fe^{3+} or Cu^{2+}

$$L_t = [L^{n-}] \cdot \alpha_L + [L^{n-}] \cdot [M^{n+}] \cdot \alpha_{ML} \quad (11)$$

$$ML_t = [L^{n-}] \cdot [M^{n+}] \cdot \alpha_{ML} \quad (12)$$

$$M_t = [M^{n+}] \cdot \alpha_M + [L^{n-}] \cdot [M^{n+}] \cdot \alpha_{ML} \quad (13)$$

where $\alpha_L = 1 + \sum_{n=0}^{n=6} \beta_{H_n L} \cdot [H^+]^n$; $\alpha_{ML} = \beta_{ML} + \sum_{n=-1}^{n=3} \beta_{MH_n L} \cdot [H^+]^n$ and

$$\alpha_M = 1 + \sum_{n=-1}^{n=-4} \beta_{M_n H} \cdot [H^+]^n$$

included overall constants for ligand protonation, metal chelate and hydroxylated metal formation respectively.

For a set of overall constants the free ligand and metal concentrations can be calculated using Eqs. 11-13 and the concentrations of the species of metal chelate can be calculated.

The metal chelate overall constants and their molar absorptivities are determined minimizing the difference between experimental and calculated absorbances in each

point of the curve using Microsoft Excel Solver® (see Figure 4.6 and Figure 4.7 for Fe^{3+} and Cu^{2+} systems respectively). The Solver options were precision, $1 \cdot 10^{-6}$; tolerance $1 \cdot 10^{-3}\%$; use automatic scaling; estimate, quadratic; derivatives, forward; search Newton; time, 10^3 s.; iterations, 100 and convergence, $1 \cdot 10^{-4}$ (Maleki et al. 1999)

4.7.2.3. pM values

The concentration of the free aquo metal $[M]$ calculated through Eqs. 9-13 can be expressed as:

$$[M] = \frac{\alpha_L \cdot M_T}{\alpha_{ML} \cdot (L_T - M_T)} \quad (14)$$

Proton affinities of the ligand are included in α_L term, and chelate species and other chelate species such as protonated and hydroxylated complexes are included in α_{ML} term. pFe and pCu are determined using this method.

4.7.3. Supplementary Figures and Tables.

Figure 4.4.A Photometric titration of $1 \cdot 10^{-4}$ M chelating agent solution with $4.47 \cdot 10^{-4}$ M Fe^{3+} solution. $\mu = 0.1$ M (NaCl); $t = 25.0 \pm 0.5$ °C.

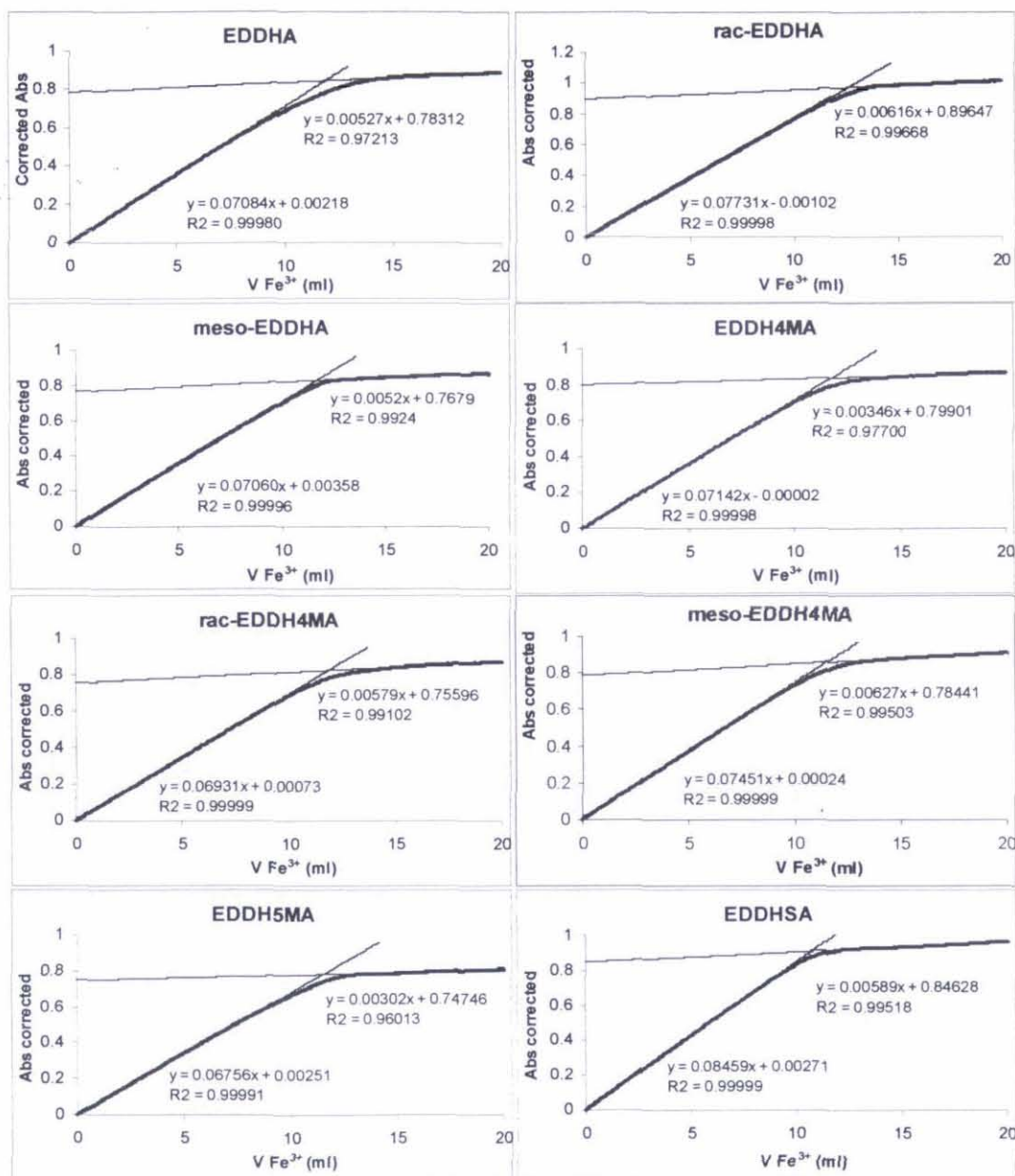
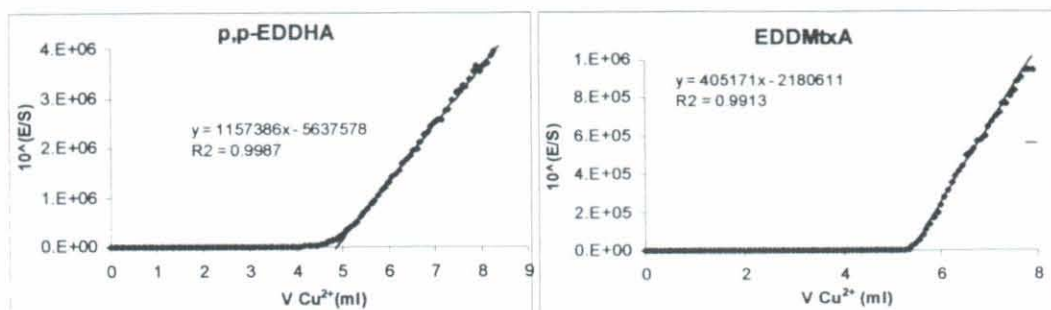
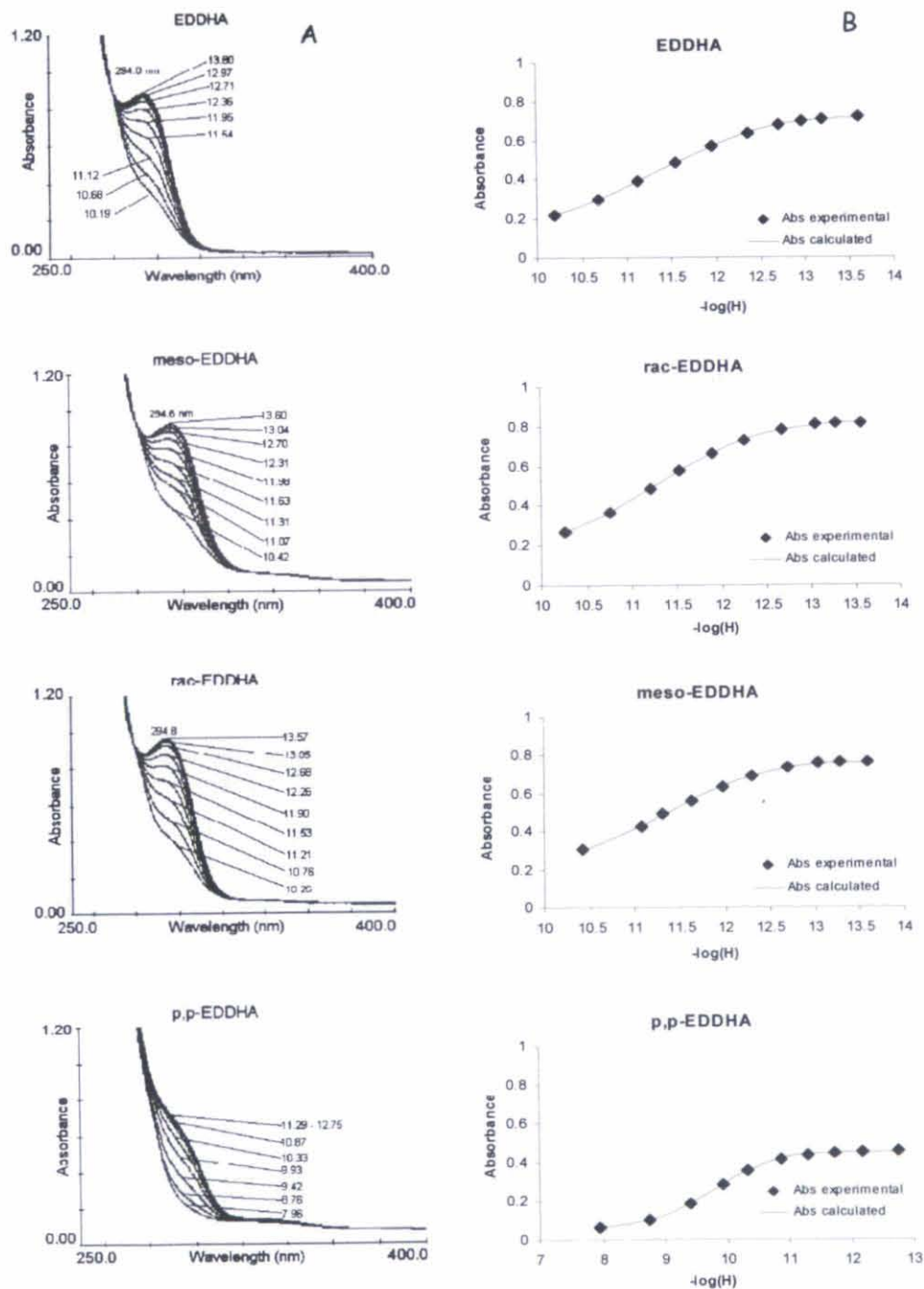


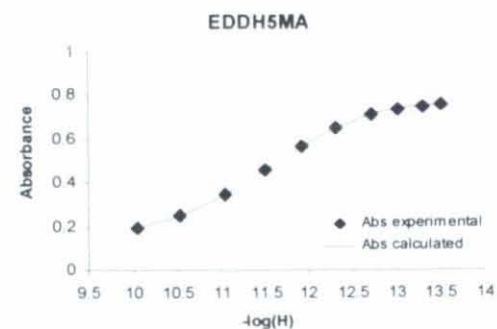
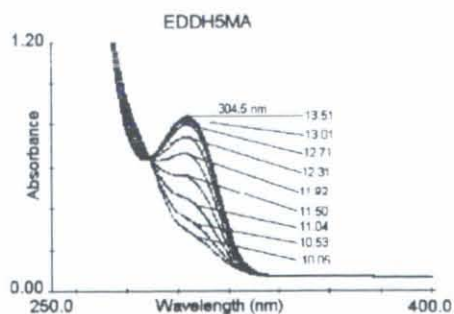
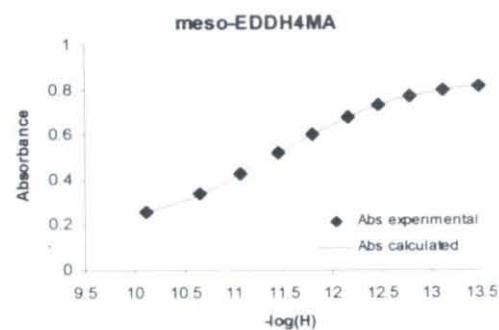
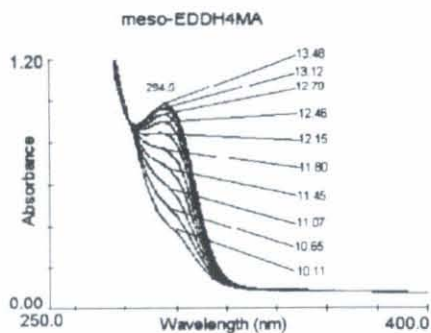
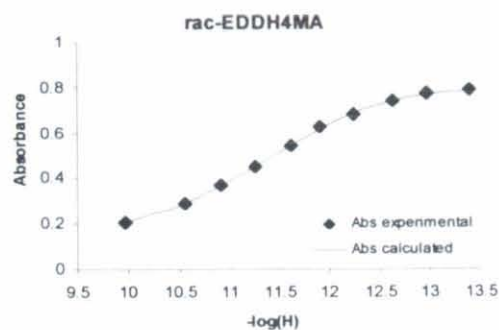
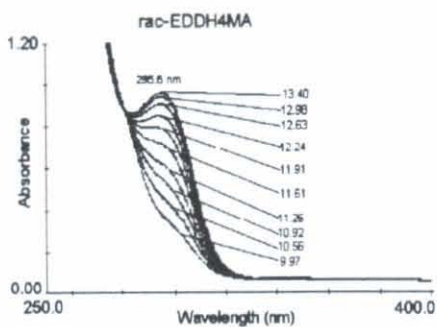
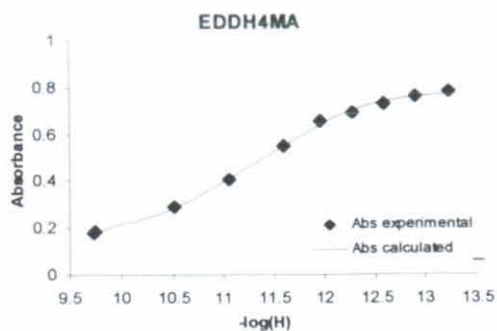
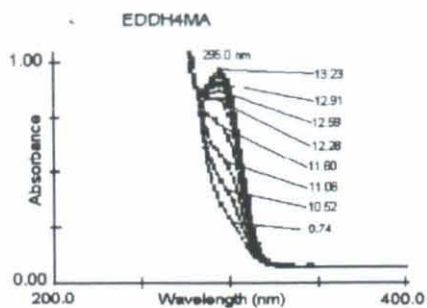
Figure 4.4.B Potentiometric titrations of $1 \cdot 10^{-3}$ M chelating agent solution with $4 \cdot 10^{-3}$ M Cu^{2+} solution. $\mu = 0.1$ M (NaCl); $t = 25.0 \pm 0.5$ °C.



4. Chelating agents related to EDDHA

Figure 4.5. A) Ultraviolet absorption spectra of each chelating agent (L) as a function of p(H). [L] = $1.00 \cdot 10^{-4}$ M; μ = 0.100 M (NaCl + NaOH); 1 cm cell; T = 25°C. B) The ultraviolet absorbance of each chelating agent (L) as a function of pH at wavelength maxima (nm); [L] = $1.00 \cdot 10^{-4}$ M; μ = 0.100 M (NaCl + NaOH); 1 cm cell; T = 25°C.





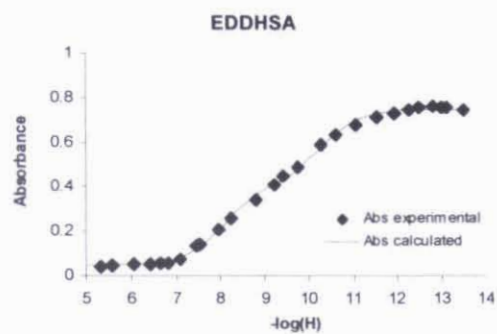
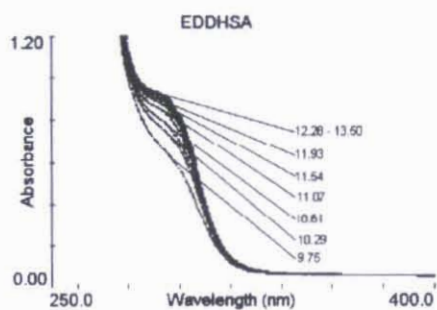
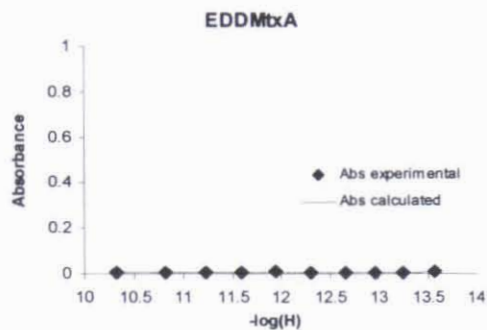
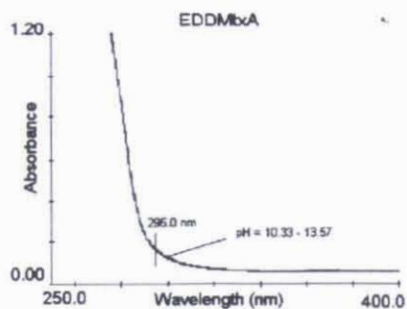


Table 4.7. Phenolate absorption bands and Molar absorptivities of chelating agents^a

Ligand	λ_{\max}	ϵ_L	ϵ_{HL}	ϵ_{H2L}
EDDHA	294.0	8031	5267	1757
<i>rac</i> -EDDHA	294.8	8395	5881	1966
<i>meso</i> -EDDHA	294.6	8598	6162	2600
<i>p,p</i> -EDDHA	295.0 ^b	5077	2416	604
EDDH4MA	295.0	8532	4598	1611
<i>rac</i> -EDDH4MA	295.6	8762	5365	1838
<i>meso</i> -EDDH4MA	295.5	9243	5948	2303
EDDH5MA	304.5	8812	5045	1796
EDDMtxA	295.0 ^b	91	70	99
EDDHSA	293.0 ^b	9201	5028	544

^a $\mu = 0.1$ M (NaCl); $t = 25$ °C^btheoretical wavelength used for calculations, but no maximum observedTable 4.8. Purity^a (%) of each chelating agent and molar absorptivities at 480 nm

Ligand	Purity (%)	$\epsilon_{480\text{ nm}}$
EDDHA	90.6 \pm 0.3 ⁽¹⁾	4721 \pm 16
<i>rac</i> -EDDHA	97.4 \pm 0.5 ⁽¹⁾	4955 \pm 37
<i>meso</i> -EDDHA	89.2 \pm 0.4 ⁽¹⁾	4574 \pm 53
<i>p,p</i> -EDDHA	89.3 ⁽²⁾	nd
EDDH4MA	89.7 \pm 0.1 ⁽¹⁾	4638 \pm 51
<i>rac</i> -EDDH4MA	90.6 \pm 0.2 ⁽¹⁾	4466 \pm 81
<i>meso</i> -EDDH4MA	87.8 ⁽¹⁾	4840 \pm 74
EDDH5MA	87.6 \pm 0.1 ⁽¹⁾	4453 \pm 52
EDDMtxA	97.8 ⁽²⁾	nd
EDDHSA	81.1 \pm 0.6 ⁽¹⁾	5550 \pm 75

^a $\mu = 0.1$ M (NaCl); $t = 25$ °C⁽¹⁾Photometric titration with Fe³⁺ solution titrant⁽²⁾Potentiometric titration with Cu²⁺ solution titrant

Figure 4.6. Plot Absorbance versus pH of the Fe^{3+} chelates at 480 nm. [EDDHA] = $9.07 \cdot 10^{-5} \text{M}$, $[\text{Fe}^{3+}] = 1.03 \cdot 10^{-4} \text{M}$; [rac-EDDHA] = $9.73 \cdot 10^{-5} \text{M}$, $[\text{Fe}^{3+}] = 1.07 \cdot 10^{-4} \text{M}$; [meso-EDDHA] = $8.91 \cdot 10^{-5} \text{M}$, $[\text{Fe}^{3+}] = 9.48 \cdot 10^{-5} \text{M}$; [EDDH4MA] = $9.21 \cdot 10^{-5} \text{M}$, $[\text{Fe}^{3+}] = 9.56 \cdot 10^{-5} \text{M}$; [rac-EDDH4MA] = $9.03 \cdot 10^{-5} \text{M}$, $[\text{Fe}^{3+}] = 9.07 \cdot 10^{-5} \text{M}$; [meso-EDDH4MA] = $8.75 \cdot 10^{-5} \text{M}$, $[\text{Fe}^{3+}] = 9.21 \cdot 10^{-5} \text{M}$; [EDDH5MA] = $8.71 \cdot 10^{-5} \text{M}$, $[\text{Fe}^{3+}] = 8.72 \cdot 10^{-5} \text{M}$; [EDDHSA] = $8.10 \cdot 10^{-5} \text{M}$, $[\text{Fe}^{3+}] = 9.28 \cdot 10^{-5} \text{M}$;

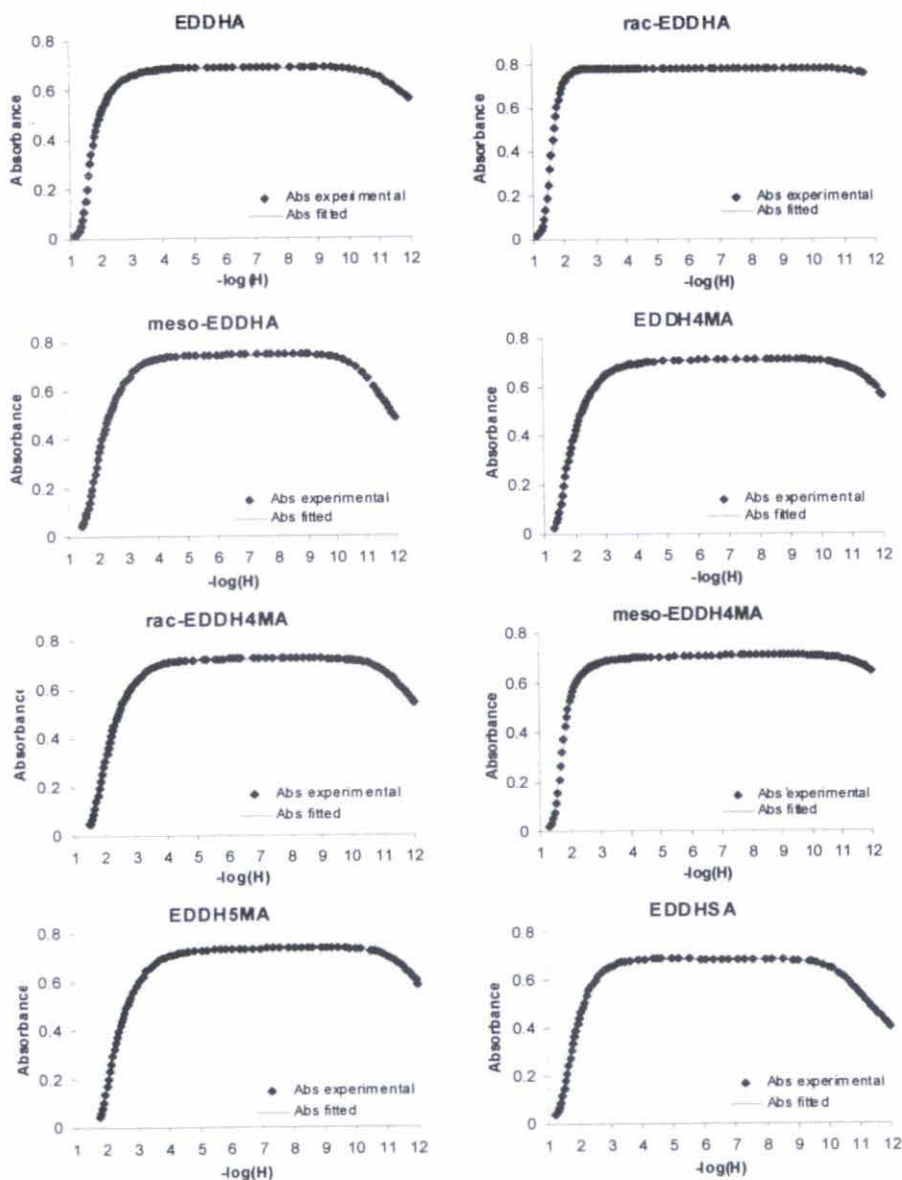
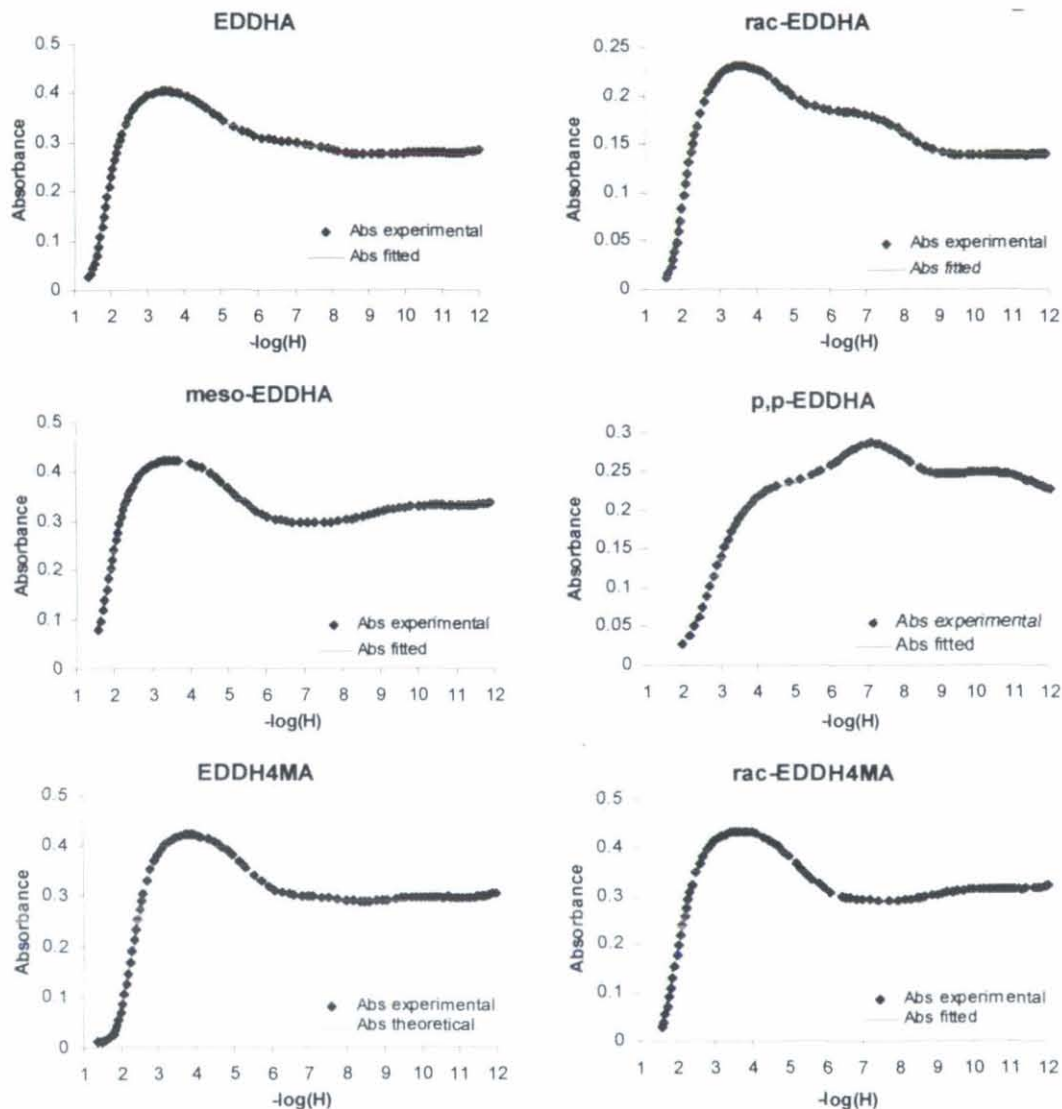


Figure 4.7. Plot Absorbance versus pH of the Cu^{2+} chelates at 650 nm. $[\text{EDDHA}] = 9.08 \cdot 10^{-4} \text{M}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 9.85 \cdot 10^{-4} \text{M}$; $[\text{rac-EDDHA}] = 4.95 \cdot 10^{-4} \text{M}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 5.07 \cdot 10^{-4} \text{M}$; $[\text{meso-EDDHA}] = 8.96 \cdot 10^{-4} \text{M}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 1.01 \cdot 10^{-3} \text{M}$; $[\text{p,p-EDDHA}] = 9.12 \cdot 10^{-4} \text{M}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 9.13 \cdot 10^{-4} \text{M}$; $[\text{EDDH4MA}] = 9.24 \cdot 10^{-4} \text{M}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 1.03 \cdot 10^{-3} \text{M}$; $[\text{rac-EDDH4MA}] = 9.07 \cdot 10^{-4} \text{M}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 1.06 \cdot 10^{-3} \text{M}$; $[\text{meso-EDDH4MA}] = 5.04 \cdot 10^{-4} \text{M}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 5.87 \cdot 10^{-4} \text{M}$; $[\text{EDDH5MA}] = 8.68 \cdot 10^{-4} \text{M}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 9.25 \cdot 10^{-4} \text{M}$; $[\text{EDDMtxA}] = 9.78 \cdot 10^{-4} \text{M}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 9.91 \cdot 10^{-4} \text{M}$; $[\text{EDDHSA}] = 8.12 \cdot 10^{-4} \text{M}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 8.07 \cdot 10^{-4} \text{M}$



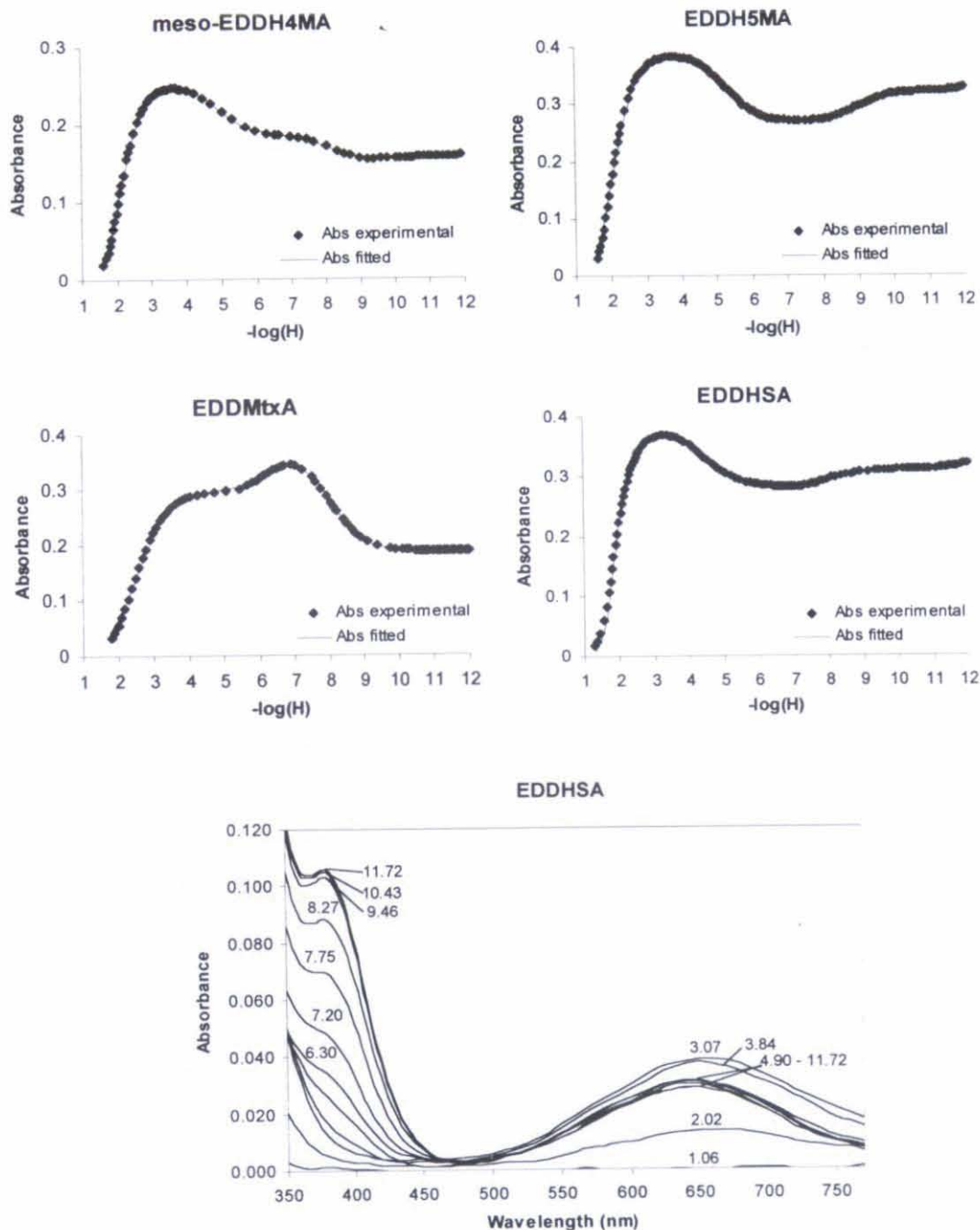


Figure 4.8. Absorbance of EDDHSA-Cu²⁺ at indicated p(H) values. 12 EDDHSA/Cu²⁺ solutions (10⁻⁴M) covering a pH range 2-12 were prepared and the spectra between 350-800 nm were obtained.

Table 4.9. pFe^o vs pH for Iron chelates.

Ligand	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9	9.5	10	10.5	11	11.5	12
EDDHA	12.6	14.6	16.6	18.5	20.4	22.1	23.7	25.2	26.7	28.0	29.3	30.3	31.3	32.3	33.1	33.8	34.5
<i>rac</i> -EDDHA	13.2	15.2	17.2	19.2	21.0	22.8	24.4	26.0	27.4	28.8	30.0	31.1	32.1	33.0	33.7	34.3	34.6
<i>meso</i> -EDDHA	11.6	13.6	15.6	17.5	19.4	21.1	22.7	24.2	25.7	27.0	28.2	29.3	30.3	31.3	32.1	32.9	33.6
EDDH4MA	12.2	14.2	16.2	18.1	20.1	21.8	23.5	25.0	26.5	27.9	29.1	30.2	31.2	32.0	32.7	33.3	33.8
<i>rac</i> -EDDH4MA	11.5	13.5	15.4	17.4	19.2	21.0	22.6	24.1	25.5	26.9	28.1	29.1	30.1	31.0	31.8	32.6	33.2
<i>meso</i> -EDDH4MA	12.7	14.7	16.7	18.7	20.6	22.4	24.0	25.5	27.0	28.4	29.6	30.7	31.7	32.6	33.4	34.0	34.5
EDDH5MA	10.8	12.7	14.7	16.7	18.6	20.5	22.1	23.7	25.2	26.6	27.8	28.9	29.9	30.8	31.6	32.3	32.9
EDDHSA	15.1	17.1	19.1	21.0	22.7	24.4	25.9	27.2	28.3	29.3	30.1	30.7	31.3	31.7	32.1	32.5	32.9

^aCalculated for [L_T] = 1.1·10⁻⁶ M, [M_T] = 1.0·10⁻⁶ M.

Table 4.10. pCu^a vs pH for copper chelates

Ligand	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9	9.5	10	10.5	11	11.5	12
EDDHA	6.9	8.0	9.2	10.6	11.9	13.2	14.3	15.5	16.8	18.1	19.3	20.4	21.4	22.3	23.0	23.5	23.9
<i>rac</i> -EDDHA	6.8	8.0	9.3	10.7	12.1	13.3	14.5	15.6	16.8	18.0	19.1	20.2	21.2	22.1	22.8	23.4	23.7
<i>meso</i> -EDDHA	6.8	7.8	9.0	10.3	11.6	12.8	13.9	14.9	15.9	16.9	17.9	18.9	19.8	20.7	21.5	22.1	22.4
EDDH4MA	5.9	6.9	8.1	9.4	10.7	12.1	13.4	14.7	16.1	17.4	18.6	19.7	20.7	21.5	22.1	22.5	22.8
<i>rac</i> -EDDH4MA	6.4	7.4	8.5	9.8	11.0	12.2	13.3	14.3	15.3	16.3	17.2	18.1	19.1	19.9	20.6	21.1	21.4
<i>meso</i> -EDDH4MA	6.5	7.6	8.8	10.1	11.5	12.7	13.9	15.0	16.2	17.4	18.6	19.7	20.7	21.5	22.3	22.8	23.2
EDDH5MA	6.5	7.5	8.7	9.9	11.2	12.5	13.7	14.8	15.8	16.8	17.8	18.8	19.7	20.6	21.3	21.9	22.2
EDDHSA	8.4	9.7	11.0	12.3	13.6	14.7	15.7	16.6	17.4	18.2	19.0	19.6	20.0	20.3	20.5	20.6	20.6
<i>p,p</i> -EDDHA	5.1	5.8	6.5	7.1	7.7	8.4	9.2	9.9	10.7	11.6	12.4	13.0	13.4	13.6	13.7	13.7	13.7
EDDMtxA	16.3	16.3	16.1	15.8	15.4	15.2	15.1	14.9	14.8	14.8	14.7	14.7	14.7	14.7	14.7	14.7	14.7

^aCalculated for [L_T] = 1.1·10⁻⁶ M, [M_T] = 1.0·10⁻⁶ M.

CAPÍTULO 5

CHELATING AGENTS RELATED TO DI(2-HYDROXYPHENYL)AMINOACETIC ACIDS: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND EQUILIBRIUM STUDIES OF THE FREE LIGANDS AND THEIR Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} AND Fe^{3+} CHELATES.

**5.Chelating agents related to di(2-hydroxyphenyl)aminoacetic acids:
Synthesis, characterization and equilibrium studies of the free
ligands and their Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+} chelates.**

pág

5.1. Table of Contents Synopsis	103
5.2. ABSTRACT	103
5.3. INTRODUCTION	104
5.4. EXPERIMENTAL SECTION	106
5.4.1. General Procedures	107
5.4.2. Determination of the purity of chelating agents	108
5.4.3. Determination of Stability Constants by Potentiometry	108
5.4.4. Spectrophotometric Equilibrium Measurements	109
5.4.5. pM values and Species Distribution	110
5.5. RESULTS AND DISCUSSION	110
5.5.1. Protonation Constants	112
5.5.2. Ca^{2+} and Mg^{2+} stability Constants	113
5.5.3. Cu^{2+} and Fe^{3+} Stability Constants	116

5.5.4. pM values and Species Distribution	118
5.6. GENERAL DISCUSSION	122
5.7. SUPPORTING INFORMATION	123

5.1. Table of Contents Synopsis.

EDDHA and other structurally related chelating agents have been synthesized by a new synthetic pathway, and their chemical behavior studied in order to predict the effect of the size of the metal ring on their efficacy as iron fertilizers. In all cases, EDDHA has formed the most stable chelate followed by PDDHA. However, when pFe is calculated, the *p*-XDDHA ligand the more stable Fe³⁺-chelate. It shows that these chelating agents can be used as ferric chlorosis correctors and they can be applied into the soil/plant system at alkaline pHs.

5.2. ABSTRACT

Today, fertilization with synthetic iron chelates is the most common agricultural practice to treat iron chlorosis of crops grown on calcareous soils. Derivates to ethylenediamine-*N,N'*-di(*o*-hydroxyphenyl)acetic (EDDHA) are among the most efficient iron chelating agents used. Several structural properties such as different substituents of the benzene ring and the size of the metal ring affect the stability of the Fe³⁺ chelates. The effect of the different substituents of the benzene ring has been already studied in a earlier paper. Therefore, the aim of this work is to study the effect of different alkyl chains, varying in length or structure, on their efficacy as iron fertilizers. PDDHA (propylendiamine-*N,N'*-di(*o*-hydroxyphenyl)acetic acid), BDDHA (butylendiamine-*N,N'*-di(*o*-hydroxyphenyl)acetic acid), *p*-XDDHA (*p*-xylylendiamine-*N,N'*-di(*o*-hydroxyphenyl)acetic acid) have been obtained following a new synthetic pathway and their chemical behavior has been studied and compared with that of EDDHA. A novel methodology was employed. Purity, protonation and Ca²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺ and Cu²⁺ stability constants, pM values and species distribution were determined to provide a comparable basis to establish the relative chelating ability of these ligands. If Mg²⁺, Cu²⁺ and Fe³⁺ stability constants are analyzed, the sequence obtained for each metal has been very similar. In all cases, EDDHA has formed the most stable chelate followed by PDDHA. pM values calculated using the first model show the same tendency than their stability constants. However, when pFe is calculated using a nutrient solution composition, the differences among pFe values decrease being the *p*-XDDHA ligand the more stable Fe³⁺-chelate. This behavior is also seen when the species distribution are obtained for each

ligand, it shows that these chelating agents can be used as ferric chlorosis correctors and they can be applied into the soil/plant system at alkaline pHs.

5.3. INTRODUCTION

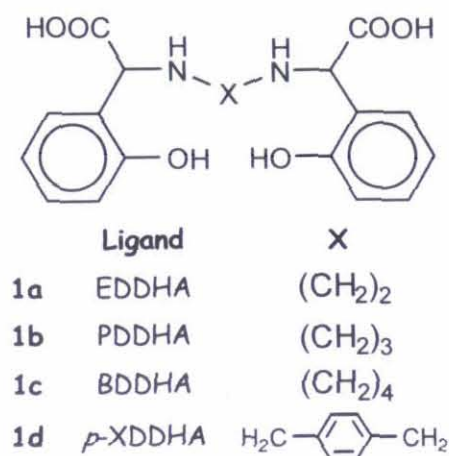
Iron chlorosis, a major problem in susceptible crops grown on calcareous soils, results in a decrease in the amount of chlorophyll and is manifested in a gradual disappearance of the green color of the plants (Mengel and Kirby, 2001; Chen and Barak, 1982; Norvell, 1991). In Europe, the 98/3/EC directive regulates the micronutrient chelate fertilizers used as they are received or incorporated in mixed fertilizers. Six chelating agents, all aminopolycarboxylic acids, are permitted to this purpose: EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid), HEDTA (N-(hydroxyethyl)-ethylenediamine-N,N'-triacetic acid), EDDHA (Ethylenediamine di(2-hydroxyphenylacetic) acid), EDDH4MA (ethylenediamine di(2-hydroxy-4-methylphenylacetic) acid) and EDDCHA (ethylenediamine di(5-carboxyl-2-hydroxyphenylacetic) acid). The latest three have two phenolate groups replacing two of the carboxylates of EDTA, which increases the stability of the iron chelate by more than 10^{10} times (Ahrland et al., 1990). Although EDTA/ Fe^{3+} has a stability constant of $\log K=25.0$, this is still not high enough to keep it from decomposing at pH values of alkaline soil to prevent precipitation of Fe^{3+} -hydroxide. For this, its use is restricted to neutral soils or to hydroponic-like cultures (Chen and Barak, 1982). EDDHA is able to complex Fe^{3+} ion more selectively than EDTA, DTPA or HEDTA and it does not decompose even in the most strongly alkaline solutions (Bucheli-Witsche and Egli, 2001).

The phenolic ligands included in the normative are EDDHA and their analogues by varying the substituents in the benzene ring. Methyl and carboxyl groups are present in EDDH4MA and EDDCHA chelating agents respectively. The effect of the different substituents of the benzene ring has been already studied in a earlier paper (Yunta et al., 2003). The methylation of the phenolic rings in different positions (EDDH4MA and EDDH5MA (ethylenediamine-di(2-hydroxy-5-methylphenylacetic) acid)) produces no significant differences in the effectiveness to form their iron chelates. However, this effectiveness is affected when more reactive groups are introduced in the benzene ring, i.e. sulphonyl groups in EDDHSA ((ethylenediamine di(2-hydroxy-5-sulphonylphenylacetic)

acid) (Yunta et al., 2003). The presence of *ortho*-hydroxyphenyl groups permit form Fe^{3+} chelates. Thus, if they are replaced by methoxyl groups (EDDMtxA (ethylenediamine di(2-methoxyphenylacetic) acid)) or the *ortho*-hydroxy groups are replaced by *para*-hydroxyphenyl groups (*p,p*-EDDHA (ethylenediamine di(4-hydroxyphenylacetic) acid) no iron chelates are formed and the subsequent precipitation of Fe^{3+} hydroxide occurs (Yunta et al. 2003).

Besides the benzene ring substituents, other structural properties affect the stability of the Fe^{3+} chelates. An essential difference between the two diastereomeric pairs of EDDHA and TMPHPG (N,N'-trimethylenedi[2-(2-hydroxy-3,5-dimethylphenyl)glycine]) that must be addressed in a comparison of their relative metal ion affinities is the alkyl chain length connecting the two hydroxyphenylglycine moieties (Bannochie and Martell, 1991). Going from EDDHA to TMPHPG changes the central chelate ring size from five to six. Only the 656 pattern [with both phenolic groups in the equatorial position, the central digit refers to the diamine chelate ring] has been found in the solid state for complexes of *rac*-EDDHA (Bailey et al, 1981; Riley et al. 1983). Greater stability was proposed and has been found for the racemic ligand on the basis of more favorable octahedral geometry achieved by placement of both six-membered chelate rings with their greater bite in the plane defined by the ethylenediamine ring (Bernauer, 1976; Bannochie and Martell, 1989). However, when *rac*-TMPHPG is in the [666] configuration, the two carboxylate oxygens cannot quite reach the axial positions to satisfy an octahedral coordination environment. Hence, this particular configuration has considerable strain, while the [565] form [both carboxylic groups in the equatorial position] is able to achieve a quite satisfactory octahedral environment. The [555] configuration is not found for *rac*-EDDHA, but the corresponding [565] form for *rac*-TMPHPG is probably the preferred configuration. Therefore, a further increase in the diamine alkyl chain length will undoubtedly serve to further isolate the two phenylglycine moieties and result in an additional decrease in the difference in metal ion affinity displayed by the diastereomers (Bannochie et al., 1991).

Figure 5.1. Structure of chelating agents.



On the other hand, several authors have pointed out that the size of a metal ion is related to its preference to form five- or six-membered chelate rings (Thom et al., 1985; Hancock, 1986 and 1989). Thus, when the $\Delta \log K$ from EDTA to TMDTA (trimethylenediaminetetraacetic) are compared with the metal ion radius from a wide variety of metal ions, it is seen that as metal ion radius increases, so the drop in complex stability on passing from the five-membered chelate ring (EDTA) to the six-membered chelate ring (TMDTA) becomes more marked (Hancock and Martell, 1989).

During our ongoing work directed toward the development of new chelating agents for the treatment of iron chlorosis (Sierra et al., 2002), as well as to determinate the presence of impurities in commercial formulations (Álvarez-Fernández et al., 2002), several chelating agents analogous to EDDHA with different alkyl chain length has been synthesized starting from the corresponding imines derived from different hydroxybenzaldehydes and using trimethylsilylcyanide as the cyanide transfer. Among the di(2-hydroxyphenyl)aminoacetic acids synthesized, a series of products (see Figure 5.1) with the amine groups linked by different alkyl chains varying in length (ethylen, propylen, and butylen) or structure (*para*-xylylen) are considered in this work. White et al, 1988 already synthesized chelating agents related to di(*o*-hydroxyphenyl)acetic with different methyl numbers among the amine groups (from 2 to 5.1) in order to provide novel complexes of Fe²⁺, Fe³⁺, Mn²⁺, Mn³⁺, Gd³⁺ and Cr³⁺ for use in enhancing magnetic resonance images of body organs and tissues.

Also it is reported the characterization and equilibrium studies of the free ligands, and their Mg²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺ and Fe³⁺ using the novel methodology described elsewhere in order to test their ability as iron chlorosis correctors (Yunta et al., 2003).

5.4. EXPERIMENTAL SECTION

5.4.1. General Procedures.

^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded in CDCl_3 , on a Varian XL-300S (299.94 MHz for ^1H and 75.43 MHz for ^{13}C), a Bruker 250-AC (250.13 MHz for ^1H and 62.90 MHz for ^{13}C), a Bruker 200-AC (200.13 MHz for ^1H and 50.03 for ^{13}C MHz) and a Bruker Avance-300 (300.13 MHz for ^1H and 75.48 MHz for ^{13}C) spectrometers. Chemical shifts are given in ppm relative to TMS (^1H , 0.0 ppm), or CDCl_3 (^{13}C , 77.0 ppm). IR spectra were taken on a Perkin-Elmer 781 spectrometer. Potentiometric measurements were performed with a Metrohm 719 and/or 721 potentiometers (precision of 0.1 mV) and a Metrohm combined pH glass. Photometric titrations were carried out using a Metrohm 662 photometer (resolution of $10\text{ nm} \pm 0.1\text{nm}$) with a white light spectrode of path length $2 \times 10\text{ mm}$. Both potentiometers were controlled by a TiNet 2.4 software program for PC.

Flame-dried glassware and standard Schlenk techniques were used for oxygen or water sensitive reactions. All reagents used in this work were of analytical grade. All aqueous solutions were prepared with CO_2 -free, water type I grade (Ahrland et al., 1990). CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl , NaOH , $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, HCl and Fe^{3+} standard solutions were obtained from Merck Chemical Co and they were properly standardized. A Gran's plot analysis was used to check for carbonate contamination of the standard aqueous NaOH and consistently revealed less than 0.5% of carbonate (Gran, 1952). All titrations were made under N_2 inert atmosphere (99.9995 purity grade N_2 , NaOH washed, 0.100 NaCl saturated), ionic strength fixed at 0.1 M with NaCl and at $25 \pm 0.5\text{ }^\circ\text{C}$.

Commercial buffer solutions were used to calibrate the combined pH glass electrode in order to read $-\log(\text{H}^+)$. Therefore, all equilibrium constants are calculated as mixed constants (K^m). The transformation to concentration constants (K^c) or thermodynamic constants (K°) have been readily made using the activity coefficients from Davies' equation.

PDDHA, BDDHA and *p*-XDDHA chelating agents were synthesized using the synthesis pathway described by Sierra et al. (2002). Then, the organic purity was

5. Chelating agents related to di(2-hydroxyphenyl)aminoacetic acids.

obtained by ^1H -RMN and ^{13}C -RMN. PDDHA (see 1b in figure 5.1) was obtained in 41% yield by precipitation at pH 4.3. BDDHA (see 1c in figure 5.1) was obtained in 54% yield by precipitation at pH 4.4 and *p*-XDDHA (see 1d in figure 5.1) was obtained in 73% yield by precipitation at pH 4.7.

5.4.2. Determination of the purity of chelating agents

The principle involved, equipment and the details of the method employed to determine the titrimetric purity of the free chelating agents, using spectrophotometric titration with Fe^{3+} solution and measuring the iron-chelate formed at 480 nm, has been profusely described in an earlier paper (Yunta et al., 2003). In briefly, the free ligands were previously dissolved in a volume of 0.200 M NaOH calculated to be four times the molar amount of the ligand. The pH was fixed at 6 by the addition of 2mM MES buffer [2-(*N*-Morpholino)ethanesulfonic acid]. The experimental solution (60 mL) was placed in a 150 mL thermostated jacketed reaction vessel provided with airtight cap fitted with a gas inlet and outlet tubes, combined pH glass electrode, white light spectrophotometer, two piston burettes (tips placed below the surface of the solution) and magnetic stirrer. The photometric titration consists on the addition of $4.47 \cdot 10^{-4}\text{M}$ Fe^{3+} standard solution to the chelating agent (samples of about $1 \cdot 10^{-4}\text{M}$) until the absorbance at 480 nm presented no changes. Molar absorptivities were also calculated at 480 nm for each chelating agent.

The photometric curves, used to calculate the end point using the linear segments intersection method (Willard et al., 1988) are shown in Figure 5.3 in Supporting Information.

5.4.3. Determination of Stability Constants by Potentiometry

Potentiometric titrations were described in detail elsewhere (Martell and Motekaitis, 1992). Due to the low solubility of ligands in acid medium, all data were obtained by back-titration with aqueous 0.0500 M HCl standardized titrant. Approximately 10-20 mg of chelating agents were weighted to the nearest 0.01 mg and were dissolved using four or six equivalents of NaOH (0.200 M). When appropriate, Ca^{2+} or Mg^{2+} solution were added in ligand:metal (1:1) and (1:10) ratio. The solutions were

diluted to a final volume of 50.0 mL. A volume of 25 mL of the experimental solution was back-titrated to pH 2.5 or until precipitation of ligand occurred.

All formation constants, except for the protonation constants corresponding with phenol dissociations, were calculated using the FORTRAN program BEST (Martell and Motekaitis, 1992; Motekaitis and Martell, 1982).

5.4.4. Spectrophotometric Equilibrium Measurements

The first and second protonation constants were measured spectrophotometrically (L'Eplattenier et al, 1967), since the combination of protons with the phenolic groups are accompanied by extensive changes in the absorption spectra. For each ligand, ten-twelve $1 \cdot 10^{-4}$ M solutions were prepared and pH adjusted from 10.0 to 13.8 with in 0.3-0.5 pH interval. 250 - 400 nm spectra were obtained for each free ligand in a Shimadzu UV-VIS spectrophotometer. Wavelength on the maximum absorbances and molar absorptivities of L^+ and LH_2^{2-} species were initially estimated at pH 13.5 and 10 respectively for each chelating agent (at these pHs the other species are in low concentration) and used as seed for the calculations.

The spectroscopy equilibrium curves and wavelength chosen for the determination of the first two phenolate protonations are shown in Figure 5.4 and Table 5.7 in Supporting Information respectively.

Stability constants for the (K_{FeL} , K_{FeHL} , $K_{Fe(OH)L}$, K_{CuL} , K_{CuHL} and K_{CuH_2L}) chelates were calculated from spectrophotometric data obtained after base titration and using the theoretical model presented by Yunta et al., (2003). The experimental iron-chelate solution ($1 \cdot 10^{-4}$ M; 25 mL) were placed in a 50-mL thermostated jacketed reaction vessel. For the Fe^{3+} chelate, the experimental solution was titrated with aqueous 0.200 M NaOH titrant to pH 12. The absorbance of the solution was measured at 480 nm at each 0.05-0.1 pH interval, depending of the curve zone.

25 mL of Cu^{2+} -chelate $1 \cdot 10^{-3}$ M experimental solution, in the same conditions used for the iron complex, were titrated with aqueous 0.200 M HCl titrant until the solution

was colorless or precipitation was observed. The absorbance of the solution was measured at 650 nm at 0.05-0.1 pH intervals, depending on the curve zone.

The potentiometric curves with Fe^{3+} and Cu^{2+} are shown in the Supporting Information (Figure 5.5 and 5.6 respectively).

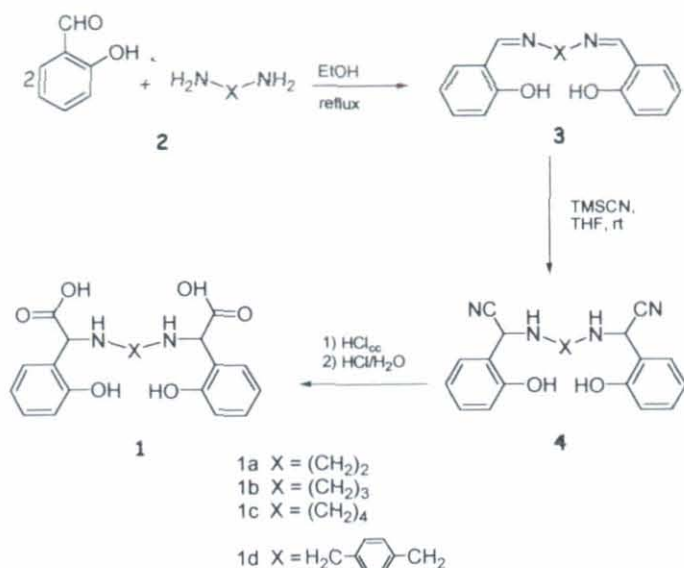
5.4.5. pM values and Species Distribution

A more reliable parameter for ligand effectiveness is the pM value, where $\text{pM} = -\log [\text{M}]$, is similar to the "chemical potential" of the aquo metal ion. A comparison of the total sequestering ability of ligands can be made through the determination of pFe and pCu values using two different models (Yunta et al., 2003). In the first model, the calculation of $[\text{M}]$ was made considering only the proton affinities of the ligand and other chelate species such as protonated metal complexes, according to Bannochie and Martell (1991). These values were computed using a 10% excess of ligand. In the second model, pM values were calculated in a nutrient solution system using equilibrium speciation model MINTEQA2 program (Allison et al., 1990) and Hoagland nutrient solution (Halvorson and Lindsay, 1972). pFe values were calculated at 4-12 pH range.

The distribution of species was determined by means of theoretical models considering the conditions in which they are applied. With this aim a model was employed to know the behavior of the chelating agents in solution at 4-13 pH range. Species distribution was established using the same methodology than that used to calculate pFe in agronomic conditions (second model) (Yunta et al., 2003)

5.5. RESULTS AND DISCUSSION

The synthesis of ligands **1** was done starting by using salicylaldehyde and the corresponding diamine derived (ethylenediamine, propylenediamine and *p*-xylylenediamine) in boiling absolute EtOH. The synthesis pathway of EDDHA (**1a**) has been already described elsewhere (Yunta et al., 2003) The diimines **3**, were obtained either as pure compounds from the reaction medium or recrystallized from EtOH. Imines **3** were reacted with TMSCN in anhydrous THF at rt to yield the corresponding α -aminonitriles **4**. The



Scheme 5.1. Synthesis of EDDHA (1a) PDDHA (1b), BDDHA (1c) and *p*-XDDHA (1d) (Sierra et al.

hydrochloride. Compounds **1** were isolated as a 1:1 mixture of diastereomers in all cases and their analytical and spectroscopic data were consistent with the proposed structures. The purity of the chelating agents synthesized was higher than 90% by ¹H NMR.

The titrimetric purity of the chelating agents **1b-d** is higher than 70%. PDDHA showed a higher purity (95.5 %) than EDDHA (90.6%), which was determined in previous work using the same method (Yunta et al., 2003). The molar absorptivities of all the Fe³⁺ chelates are of the same order of magnitude due to both phenolate groups are coordinated to Fe³⁺ (see Table 5.6 in the Supporting Information). The lower molar absorptivities for BDDHA and *p*-XDDHA are due to the absorption maximum for Fe-phenolate bands are 507.0 nm and 513.0 nm respectively and the titrimetric purity have been determined at 480 nm. In a recent paper we concluded that titrimetric purity was a better parameter to describe the complexing capacity of the products than the purity obtained by NMR technique (Yunta et al., 2003).

The differences found among the purities for BDDHA and *p*-XDDHA when both ¹H-RMN and photometric methods are compared could be due to several factors. The presence of inorganic impurities as well as insoluble compounds which can not be

presence of an *o*-hydroxy group in the aromatic ring made compounds highly reactive, and they were submitted to acid hydrolysis without further purification by sequential treatment with concentrated HCl and diluted HCl (Scheme 5.1). The pure amino acids **1a**, **1b** and **1d** were obtained by precipitation from the reaction mixture, by adjusting the solution to pH 3 with NaOH 6M. Amino acid **1c** was obtained as their

quantified by the ^1H -RMN or the lower affinity of BDDHA and *p*-XDDHA chelating agents with Fe^{3+} at pH 6 producing that no BDDHA/ Fe^{3+} and *p*-XDDHA/ Fe^{3+} are completely formed at pH chosen can be affecting over the purity of these chelating agents.

5.5.1. Protonation Constants

The first four protonation constants corresponding with the protonation of the two phenolate groups (K_1^H and K_2^H) determined by photometric method and the two amine groups (K_3^H and K_4^H) determined by potentiometric method for ligands **1b-d** and the comparison with those of EDDHA are shown in Table 5.1.

Table 5.1. log Protonation Constants^a for chelating agents.

Constants	K_1^H	K_2^H	K_3^H	K_4^H
Quotient	$[\text{HL}]/[\text{H}][\text{L}]$	$[\text{H}_2\text{L}]/[\text{H}][\text{HL}]$	$[\text{H}_3\text{L}]/[\text{H}][\text{H}_2\text{L}]$	$[\text{H}_4\text{L}]/[\text{H}][\text{H}_3\text{L}]$
EDDHA ^b	11.94	10.73	8.66 ± 0.04	6.18 ± 0.06
PDDHA	12.17	11.08	8.79 ± 0.02	7.07 ± 0.11
BDDHA	11.96	10.89	8.73 ± 0.07	7.49 ± 0.23
<i>p</i> -XDDHA	11.70	10.86	8.50 ± 0.03	6.89 ± 0.20

^a $\mu = 0.1 \text{ M (NaCl)}$; $t = 25^\circ\text{C}$. ^bYunta et al., (2003)

No protonation constants corresponding to the carboxylate oxygens, K_5^H and K_6^H could be determined because after addition of the fourth equivalent of acid in the back-titration the precipitation of the ligands occurred (Bannochie and Martell, 1989).

As the size of the chain increases from two (EDDHA) to four carbons (BDDHA) the two nitrogens are more independent and then there is less charge repulsion between them. Thus, addition of a fourth equivalent of acid results in less charge repulsion between the nitrogens of PDDHA and BDDHA and the value of Log K_4^H increases by 0.89 and 1.31 order the magnitude respectively over that observed in EDDHA (Table 5.1).

The difference between $\text{Log } K_3^H$ and $\text{Log } K_4^H$ (corresponding to the two nitrogen protonations) is smaller for BDDHA (1.24) than for PDDHA (1.72) and both of them smaller than for EDDHA (2.48). For PDDHA this difference is similar to those found for both isomers of TMPHPG (Bannochie and Martell, 1991), a chelating agent with the same central chain (*rac*-TMPHPG = 1.61 and *meso*-TMPHPG = 1.81).

However, the $\text{log } K_3^H$ of *p*-XDDHA is less basic than of EDDHA, although the difference between $\text{Log } K_3^H$ and $\text{Log } K_4^H$ is smaller for *p*-XDDHA (1.61) due to the fourth protonation constant. This fact could be explain since the effect of the benzene ring on the acidity of the ammonium groups.

The behavior of the most basic ammonium group of these ligands is in a good agreement with those described earlier. Thus, the $\text{log } K_3^H$ reported for EDDHA, PDDHA, BDDHA and *p*-XDDHA were 8.65 ± 0.30 ; 9.01 ± 0.30 ; 9.15 ± 0.30 ; 8.10 ± 0.30 respectively. Therefore, when the methylen groups are introduced subsequently into the diamine bridge, i. e. from 2 to 4, the basicity of the most basic nitrogen increase. However, the presence of a *p*-xylylen among the diamine bridge produces a decrease of the basicity in the most basic nitrogen.

5.5.2. Ca^{2+} and Mg^{2+} stability Constants

Ca^{2+} and Mg^{2+} stability constants for ligands 1a-d are shown in Table 5.2. From the Ca^{2+} and Mg^{2+} potentiometric curves, it may be presumed the existence of at least three species of the metal chelates: MH_2L , MHL^- and ML^{2-} . In order to compare the stability of such metal-ligand complexes, the equilibrium K_{ML} , and therefore its $\text{Log } K_{\text{ML}}$, is used (Bucheli-Witschel and Egli, 2001). Mg^{2+} stability constants are higher than those of Ca^{2+} for all the products. This behavior is in good agreement with that found elsewhere for EDDHA (Yunta et al., 2003) and their analogues (HBED, L'Eplattienier et al., 1967). Ligand architecture (Hancock, 1989) and metal properties (Pearson, 1963) (size of the metal, charge, ionic radius and so on) were already used to explain this fact.

Mg^{2+} is more affected than Ca^{2+} by the addition of methyl groups from two (EDDHA) to four (BDDHA) (table 5.2). This fact is contrary to several theories related to chelating agents with different chelate ring size indicating that an increase of the

chelate ring size leads to a greater degree of complex destabilization for larger metal ions (i.e. calcium) than for smaller metal ions (i.e. magnesium) (Hancock, 1986). However, this fact has been shown for chelating agents such as EDTA and their analogues (EN (ethylenediamine), TN (trimethylenediamine), and TMDTA) but not for phenolic ligands such as EDDHA and their analogues that may have a different behavior (in fact for EDTA and their analogues, Ca^{2+} chelates are more stable than the Mg^{2+} chelates, but for EDDHA and their analogues (table 5.2), Ca^{2+} chelates are less stable) (Yunta et al., 2003; Lindsay, 1979; Frost et al., 1958).

In the case of Mg^{2+} , the five-membered chelate ring formed (EDDHA) is more stable than those of six- (PDDHA) or seven-membered (BDDHA) chelate ring formed. In the case of Ca^{2+} (larger metal ion), a increase in the alkyl chain not produce a clear effect over their stability constants due to the poor affinity between calcium and these type of the phenolic ligands.

In both Ca^{2+} and Mg^{2+} systems, *p*-XDDHA has the lowest stability constants. When *p*-XDDHA is compared with EDDHA both the increase in chelate ring size and the increase in level of preorganization are affecting their availability to form complexes. Several authors pointed out that the increase in level of preorganization leads to an increase in complex stability (EDTA versus CDTA (*trans*-1,2-diaminocyclohexane, *N,N,N,N'*,-*N'*-tetraacetic acid)) (Hancock, 1989). But in this case the larger chelate ring size produces a more decrease in the Ca^{2+} and Mg^{2+} stability constants and this fact is more affecting than the level of preorganization. Furthermore, in this case the increase of the preorganization level for *p*-XDDHA produces a drop in the ability to form any metal chelates because the structure fixed no is suitable to form stable chelates.

Table 5.2. Log Stability constants^a for Ca²⁺ and Mg²⁺ Chelates.

Element	Ca ²⁺			Mg ²⁺		
	[ML]/[L][M]	[MHL]/[H][L][M]	[MH ₂ L]/[H] ² [L][M]	[ML]/[L][M]	[MHL]/[H][L][M]	[MH ₂ L]/[H] ² [L][M]
EDDHA ^b	7.29 ± 0.30	16.77 ± 0.33	25.95 ± 0.50	9.76 ± 0.05	18.18 ± 0.15	25.36 ± 0.24
PDDHA	6.17 ± 0.19	16.43 ± 0.40	25.86 ± 0.40	8.81 ± 0.08	17.33 ± 0.27	25.57 ± 0.64
BDDHA	7.16 ± 0.06	16.31 ± 0.38	25.47 ± 0.14	7.52 ± 0.44	16.15 ± 0.54	25.14 ± 0.61
p-XDDHA	6.05 ± 0.22	16.55 ± 0.33	25.07 ± 0.24	7.35 ± 0.49	16.59 ± 0.53	24.85 ± 0.51

^aμ = 0.1 M (NaCl); t = 25 °C. ^bYunta et al., 2003Table 5.3. log Stability constants^a for Cu²⁺ and Fe³⁺ Chelates.

Element	Cu ²⁺			Fe ³⁺		
	[ML]/[L][M]	[MHL]/[H][L][M]	[MH ₂ L]/[H] ² [L][M]	[ML]/[L][M]	[MHL]/[H][L][M]	[MOHL]/[H] ⁻¹ [L][M]
EDDHA ^b	25.13 ± 0.00	32.61 ± 0.01	37.31 ± 0.01	35.09 ± 0.28	36.89 ± 0.21	23.66 ± 0.27
PDDHA	22.31 ± 0.14	31.73 ± 0.08	38.88 ± 0.05	33.54 ± 0.23	35.84 ± 0.22	21.74 ± 0.14
BDDHA	19.55 ± 0.16	28.68 ± 0.05	35.38 ± 0.05	29.69 ± 0.17	33.66 ± 0.08	18.75 ± 0.25
p-XDDHA	17.52 ± 0.13	26.59 ± 0.09	nd	30.13 ± 0.18	34.12 ± 0.19	nd

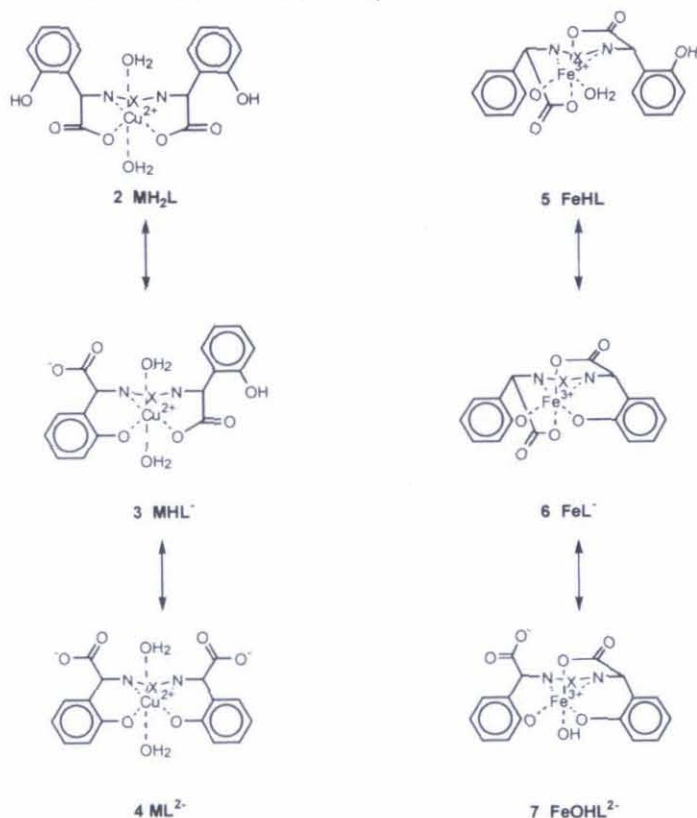
^aμ = 0.1 M (NaCl); t = 25 °C. ^bYunta et al., 2003

5.5.3. Cu^{2+} and Fe^{3+} Stability Constants

The Fe^{3+} and Cu^{2+} stability constants are showed in Table 5.3. EDDHA chelating agent presents the highest stability with Fe^{3+} and Cu^{2+} metals. When the alkyl chain length among the amino groups is increased, the stability of the Fe^{3+} and Cu^{2+} chelates formed is decreasing. Thus the sequence obtained is $\text{EDDHA} > \text{PDDHA} > \text{BDDHA}$ for the Fe^{3+} and Cu^{2+} systems. $p\text{-XDDHA}/\text{Fe}^{3+}$ is slightly more stable than $\text{BDDHA}/\text{Fe}^{3+}$, this fact is contrary to the tendency observed when the alkyl chain length increase. The presence of a benzene ring among the two amine groups in $p\text{-XDDHA}$ could produce a interaction between benzene ring and Fe^{3+} metal, like teh ferrocene structures, resulting in a increase of the stability of $p\text{-XDDHA}/\text{Fe}^{3+}$. The steric orientation of donor groups could explain the stability differences among the chelating agents.

The different Cu^{2+} chelate species are represented in Scheme 5.2. At low pHs, a

Scheme 5.2. Cu^{2+} and Fe^{3+} species formed



blue Cu^{2+} complex is observed, which no doubt involves only coordination to the ethylenediamine nitrogens, the carboxylate oxygens and two molecules of water (2 in Scheme 5.2) (Patch et al., 1982). The upper pH value for the range at which this species is predominant is different depending on the chelating agent (4.70, 7.15 and 6.70 for $\text{EDDHA}/\text{Cu}^{2+}$, $\text{PDDHA}/\text{Cu}^{2+}$ and $\text{BDDHA}/\text{Cu}^{2+}$) respectively. Since a precipitate appears at pH below 8 for $p\text{-XDDHA}/\text{Cu}^{2+}$, the stability constant for its

diprotinated specie cannot be determined. A new more strongly green complex is formed as the pH rises. This complex involves the coordination of the Cu^{2+} with the phenolate groups (4 in Scheme 5.2) at pH above 7.48, 9.42, 9.13 and 9.07 for EDDHA/ Cu^{2+} , PDDHA/ Cu^{2+} , BDDHA/ Cu^{2+} and *p*-XDDHA/ Cu^{2+} respectively. Finally, species 3 appears at intermediate pH values and involve the two amino groups, one carboxylate group and one phenolate group. When the chelate ring size increase, the Cu^{2+} stability constants decrease. Five-membered chelate ring (EDDHA) shows the most stable Cu^{2+} chelate (table 5.3).

The Fe^{3+} chelate species are also represented in Scheme 5.3. The predominant species involves the coordination with the nitrogen atoms, the carboxylate oxygens and the phenolate groups (6 in Scheme 5.3) and it occurs at pH above 1.89, 3.42, 3.97 and 3.99 for EDDHA/ Fe^{3+} , PDDHA/ Fe^{3+} , BDDHA/ Fe^{3+} and *p*-XDDHA/ Fe^{3+} respectively. The hydroxylated (8) species, where one carboxylate is replaced by a OH group, occurs at pH above 11. No hydroxylated *p*-XDDHA/ Fe^{3+} have been determined because the chelate is decomposed and its stability constant can not be obtained. The protonated specie (5) involves the coordination with one water molecule instead one phenolate group.

White et al. (1988) reported the synthesis of several chelating agents analogous to EDDHA with different diamine alkyl chain length (from 2 to 5) and the stability of the complexes with Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mn^{3+} , Gd^{3+} or Cr^{3+} . These authors concluded that the preferred ligand is one in which $m = 2$, i.e. ethylenediamine-di(o-hydroxyphenyl)acetic acid), (EDDHA). The effect of the size of the chelate ring in the metal stability have been also studied in other chelating agent with similar structure. HBTDA/ Fe^{3+} (N,N'-di-(2-hydroxybenzyl)-trimethylenedinitrilo)-N,N'-diacetic acid) stability constant ($\log K_{\text{FeL}} = 37.8$) (Ahrland et al., 1990) is lower than the of HBED/ Fe^{3+} (N,N'-(di-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-diacetic acid) ($\log K_{\text{FeL}} = 39.7$) reported by L'Eplattenier et al. (1967). The same tendency was observed when the stability constants of HBED/ Fe^{3+} , HPED/ Fe^{3+} (N,N'-(di-hydroxybenzyl)-N,N'-ethylenediaminediacetic acid) and HBEP/ Fe^{3+} (N,N'-(di-hydroxybenzyl) -N,N'- ethylenediaminedi-3-propionic acid) were compared. All are sexadentate and have two phenolate donors, two nitrogen donors and two carboxylate donors. Increasing the chelate ring size from six members (HBED) to seven members (HBEP) causes the stability constants of Fe^{3+} chelates to decrease from $\sim 10^{39}$ to $\sim 10^{31}$ (in this case the chelate ring compared is the formed between Fe^{3+} and the

5. Chelating agents related to di(2-hydroxyphenyl)aminoacetic acids.

carboxylate groups). Steric factors strongly affect stability constants. On the other hand, decreasing the chelate ring size from six members (HBED) to five members (HPED) correlates with a stability constant decrease of the Fe^{3+} chelate from $\sim 10^{39}$ to $\sim 10^{32}$ (in this case the chelate ring formed between Fe^{3+} and phenolate groups are compared). Molecular models show that the coordination sphere is considerably more crowded and constrained in the HPED chelates than the corresponding complexes of HBED because donor groups in HPED involved in five-membered rings are less flexible than are the groups involved in six-membered chelate rings formed in HBED (Ma and Martell, 1993; Lucena et al., 1996). Therefore, HBED, with five and six-membered chelate ring (metal-amino-carboxylate and metal-amino-phenolate respectively), as EDDHA, is expected to form the most stable HBED/ Fe^{3+} stability constants. The difference is similar to that presented in this work for EDDHA (five-membered chelate ring) and PDDHA (six-membered chelate ring) (see table 5.3). A further increase in the diamine alkyl chain length will serve to further isolate the two phenylglycine moieties and result in an additional decrease in the stability with metal ions such as Fe^{3+} .

EDDHA and their analogues are formed for two diastereoisomers (racemic mixture, SS and RR, and meso, SR, forms). The two diastereoisomers have been separated (Bailey et al., 1981), and their protonation and metal stability constants determined (Yunta et al., 2003; Bannochie and Martell, 1989). One isomer is more stable than the other and the mixture shows mean values between both isomers. This behavior has been also seen for TMPHPG isomers (Bannochie and Martell, 1991) but the increased separation of the two chiral centers in the TMPHPG diastereomers, by an additional methylene group, generally reduced the differences in stability observed between the diastereomeric complexes. Therefore, it would be expected that a increase of the size of the metal ring would produce ligands which diastereomeric complexes with very close stability.

5.5.4. pM values and Species Distribution

pFe and pCu values were determined using the first model in a 4-12 pH range. Tables 4 and 5 show the pM values obtained only for agronomic pH values.

Table 5.4. pFe^a vs pH for Iron chelates^b.

Ligand	7	7.5	8	8.5
EDDHA ^c	23.7	25.2	26.7	28.0
PDDHA	21.2	22.8	24.4	25.8
BDDHA	17.5	19.3	20.9	22.4
P-XDDHA	18.8	20.4	21.9	23.3

^aCalculated for $[L_T] = 1.1 \cdot 10^{-6}$ M, $[Fe_T] = 1.0 \cdot 10^{-6}$ M.

^bFor pFe data in the whole pH range see Supporting Information (Table 5.8)

^cYunta et al. 2003

From the pFe values listed in table 5.4, the ligand EDDHA and PDDHA are the most effective ligands. BDDHA is the poorest ligand in all pH range. In fact, the pFe values follow the same sequence that iron stability constants (see table 5.3). EDDHA and PDDHA could be applied into soil/system and they can be used as ferric chlorosis correctors. However, if pFe values are compared with those of EDTA ligand at pH 7.5 (pFe = 22.3) *p*-XDDHA and BDDHA show lower values than that of EDTA. Therefore, the application of these iron chelate into the soil/system is questionable.

The sequence obtained for pCu (table 5.5) is similar to that of pFe and it is in agreement with their Cu²⁺ stability constants (see table 3). EDDHA and PDDHA are the most effective, and *p*-XDDHA has the lowest pCu values in all pH range.

Table 5.5. pCu^a vs pH for copper chelates^b.

Ligand	7	7.5	8	8.5
EDDHA ^c	14.3	15.5	16.8	18.1
PDDHA	13.1	14.3	15.6	16.8
BDDHA	9.7	10.9	12.0	13.0
P-XDDHA	8.3	9.4	10.4	11.3

^aCalculated for $[L_T] = 1.1 \cdot 10^{-6}$ M, $[M_T] = 1.0 \cdot 10^{-6}$ M.

^bFor pCu data in the whole pH range see Supporting Information (Table 5.9)

^cYunta et al. (2003)

5. Chelating agents related to di(2-hydroxyphenyl)aminoacetic acids.

As a approach to know the chelating agent selectivity, pFe/pCu ratio is calculated for each ligand at pH 7.5 (as physiological pH). The ratios obtained are the following: *p*-XDDHA (2.17) > BDDHA (1.78) > EDDHA (1.62) \approx PDDHA (1.59). Therefore, this sequence indicate that when the amine alkyl chain is increasing, the relative selectivity for Fe³⁺ is greater than that of Cu²⁺.

pFe and pCu are very useful to compare effectiveness of these ligands when applied in solution containing only one metal. However in physiological studies and agronomic use, the iron chelates are used in systems where several other metals (i.e. Cu²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, etc) are present. The presence of those metals can modify the relative effectiveness of the iron chelates and, therefore, the pFe values could vary.

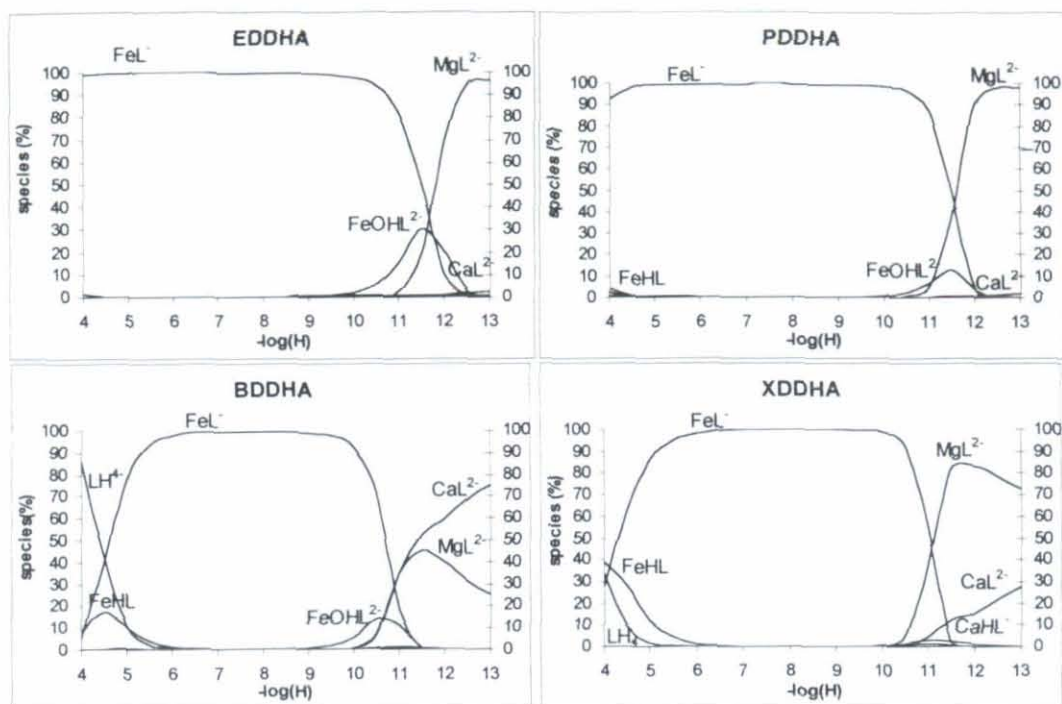
Table 5.6. pFe values against pH in agronomic conditions^a

Ligand	7	7.5	8	8.5
EDDHA	15.09	16.28	17.67	19.27
PDDHA	15.01	16.23	17.65	19.27
BDDHA	14.99	16.21	17.63	19.25
<i>p</i> -XDDHA	15.38	16.59	18.01	19.58

^a(Fe³⁺) = (Ligand) = 1.0·10⁻⁴ M; (Ca²⁺) = 1.6·10⁻³ M; (Mg²⁺) = 8.0·10⁻⁴ M; (Cu²⁺) = 3.15·10⁻⁷ M.

For this reason and as example, in the second model the pFe values were also obtained for chelating agents in a nutrient solution system (Table 5.6). These pFe values are lower than those of pFe presented in Table 5.3 for single metal chelation, due to the competition between iron and the other metals. In general, all phenolic chelating agents considered present similar pFe values in nutrient solution conditions and they can be used as chlorosis correctors. Therefore, in order to determine their effectiveness, their behavior will depend on other external factors as soil properties, way of application, culture type, meteorological conditions, solubility, etc. *p*-XDDHA ligand presents the highest affinity from Fe³⁺, this result is in accordance with the sequence for pFe/pCu ratio showed above.

Figure 5.2. Species distribution against pH using Hoagland nutrient solution composition for ligands 1a, 1b, 1c and 1e. (Fe^{3+}) = (Ligand) = $1.0 \cdot 10^{-4}$ M; (Ca^{2+}) = $1.6 \cdot 10^{-3}$ M; (Mg^{2+}) = $8.0 \cdot 10^{-4}$ M; (Cu^{2+}) = $3.15 \cdot 10^{-7}$ M.



In Figure 5.2 the species distribution curves for the chelating agents in Hoagland nutrient solution are shown and they are compared with those already calculated for EDDHA (Yunta et al., 2003). For all phenolic ligands the FeL^- species is the predominant in the whole physiological pH range. Thus, the 100% of the iron chelate remains as FeL^- species at pH below 11 for EDDHA and PDDHA and at pH above 10 for BDDHA and *p*-XDDHA. The hydroxylated FeOH L^{2-} species appear at pH around 11.0 in those ligands in which it has been possible to determine it. Only at pH above 11.5, the calcium and magnesium chelates become predominant species. Due to the low concentration of Cu^{2+} in Hoagland nutrient solution ($3.15 \cdot 10^{-7}$ M), copper chelates are not predominant in either pH range, although their stability constants are higher than those of Ca^{2+} and Mg^{2+} that are present in larger concentration. The curves are in good agreement with the pFe values, because all phenolic ligands are able to form very stable iron chelates in solution conditions. However, at acid pHs the protonated species of BDDHA/ Fe^{3+} and *p*-

XDDHA/ Fe^{3+} chelates appear significantly. Thus, FeL^- species is completely formed at pHs above 4.5, 6 and 6.5 for PDDHA, *p*-XDDHA and BDDHA respectively. This fact could be very relevant because the reactivity of these iron chelates at acid pHs is higher than that of EDDHA and this fact could affect over the stability of these iron chelates. BDDHA/ Fe^{3+} and *p*-XDDHA/ Fe^{3+} can be broken at acid pHs or they are not formed completely and the formation process can be very slowly producing a loss of Fe^{3+} by precipitation as hydroxide.

5.6. GENERAL DISCUSSION

These results are very useful in order to compare the selective complexation of chelating agents as EDDHA and their analogues wherein the alkyl chain length is varied. If Mg^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+} stability constants are analyzed, the sequence obtained for each metal has been very similar. In all cases, EDDHA has formed the most stable chelate followed by PDDHA. These metallic ions have different properties; while Mg^{2+} and Fe^{3+} are classified as hard acids, Cu^{2+} is classified as borderline although it presents a higher affinity for amine groups than Mg^{2+} and Fe^{3+} . Up to now, the preferences for five-, six- or higher-membered chelate ring depend on the size of the metal and the coordination index, so smaller ions formed preferably six-membered chelate ring and larger ions formed five-membered chelate ring. This observation satisfactorily explains the EDTA analogue TMDTA's weaker complexes with larger metal ions (Hancock, 1988). But, in this case, five-membered chelate ring, corresponding to EDDHA, is the most stable for Cu^{2+} , Mg^{2+} and Fe^{3+} , according with that reported elsewhere that five-membered chelate rings form more stable complexes than their six-membered counterparts (Basolo and Johnson, 1964).

pM values calculated using the first model show the same tendency than their stability constants. However, when pFe is calculated using a nutrient solution composition, the differences among pFe values decrease being the *p*-XDDHA ligand the more stable Fe^{3+} -chelate because this chelating agent presents the greatest pFe/pCu ratio. This behavior is also seen when the species distribution are obtained for each ligand, it shows that these chelating agents can be used as ferric chlorosis correctors and they can be applied into the soil/plant system at alkaline pHs.

5.7. SUPPORTING INFORMATION

Figure 5.3. Photometric titration of $1 \cdot 10^{-4}$ M chelating agent solution with $4.47 \cdot 10^{-4}$ M Fe^{3+} solution. $\mu = 0.1$ M (NaCl); $t = 25.0 \pm 0.5$ °C.

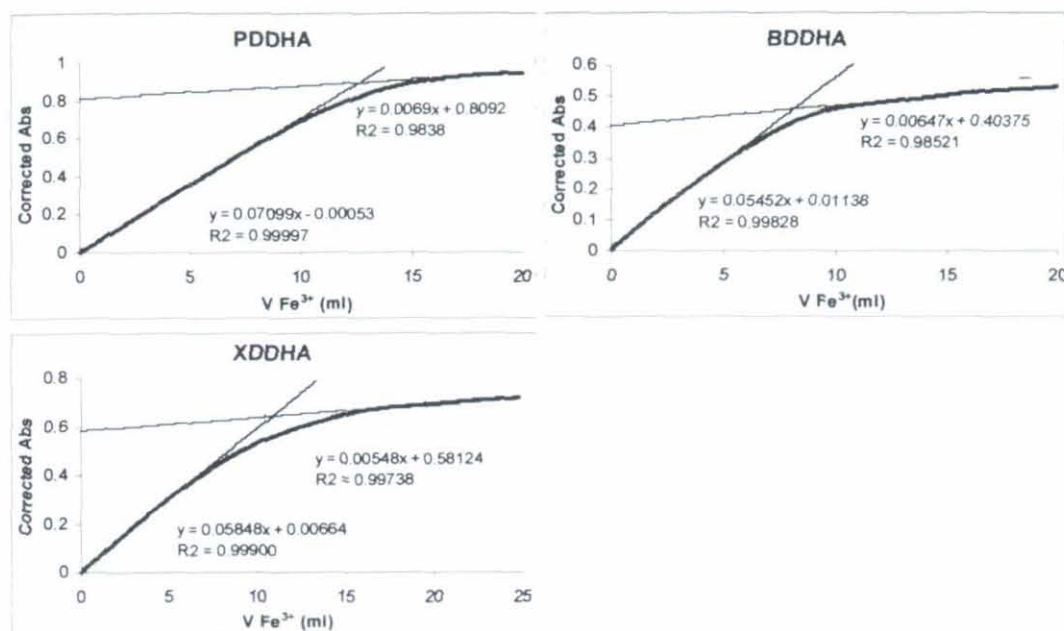


Table 5.6. Purity^a (%) of each chelating agents and Molar absorptivities at 480 nm.

Ligand	Purity (%)	$\epsilon_{480 \text{ nm}}$
EDDHA ^b	90.6 \pm 0.36	4721 \pm 166
PDDHA	95.5 \pm 0.9	4652 \pm 24
BDDHA	71.1 \pm 1.4	3751 \pm 161
XDDHA	82.9	3739 \pm 309

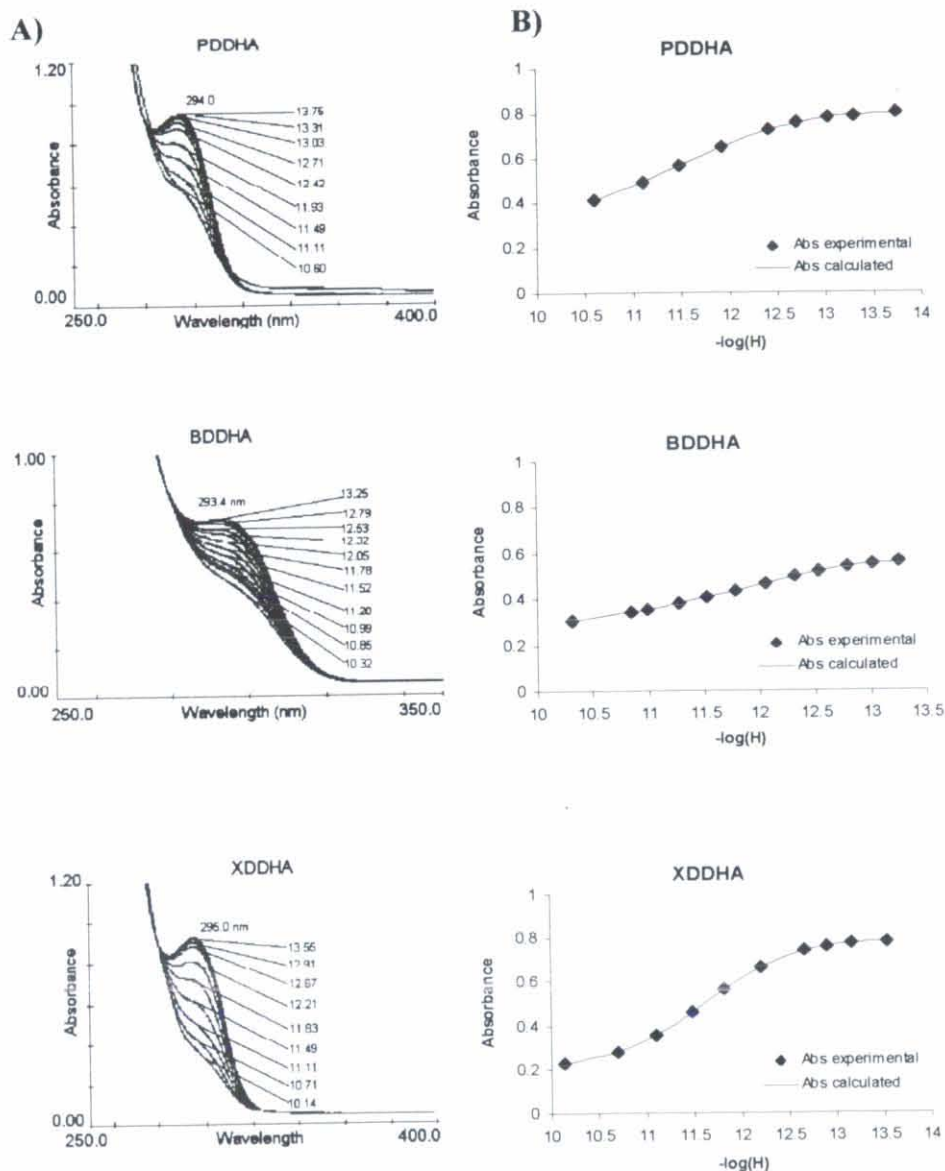
^a μ = 0.1 M (NaCl); \dagger = 25 °C. ^bYunta et al., 2003

Table 5.7. Phenolate absorption bands and Molar absorptivities of chelating agents^a

Ligand	λ_{max}	ϵ_{L}	ϵ_{HL}	ϵ_{H2L}
EDDHA	294.0	8031	5267	1757
PDDHA	294.0	8217	6452	3577
BDDHA	293.4	8027	5592	3945
XDDHA	295.0	9491	4560	2433

^a μ = 0.1 M (NaCl); \dagger = 25 °C. ^bYunta et al., 2003

Figure 5.4. A) Ultraviolet absorption spectra of each chelating agent (L) as a function of p(H). [L] = $1.00 \cdot 10^{-4}$ M; μ = 0.100 M (NaCl + NaOH); 1 cm cell; T = 25°C. B) The ultraviolet absorbance of each chelating agent (L) as a function of pH at wavelength maxima (nm); [L] = $1.00 \cdot 10^{-4}$ M; μ = 0.100 M (NaCl + NaOH); 1 cm cell; T = 25 ± 0.5 °C.



5. Chelating agents related to di(2-hydroxyphenyl)aminoacetic acids.

Figure 5.5. Plot Absorbance versus pH of the Iron(III) chelates at 480 nm. [PDDHA] = $9.6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Fe}^{3+}] = 1.06 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; [BDDHA] = $6.10 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Fe}^{3+}] = 6.50 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; [XDDHA] = $8.29 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{Fe}^{3+}] = 8.52 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

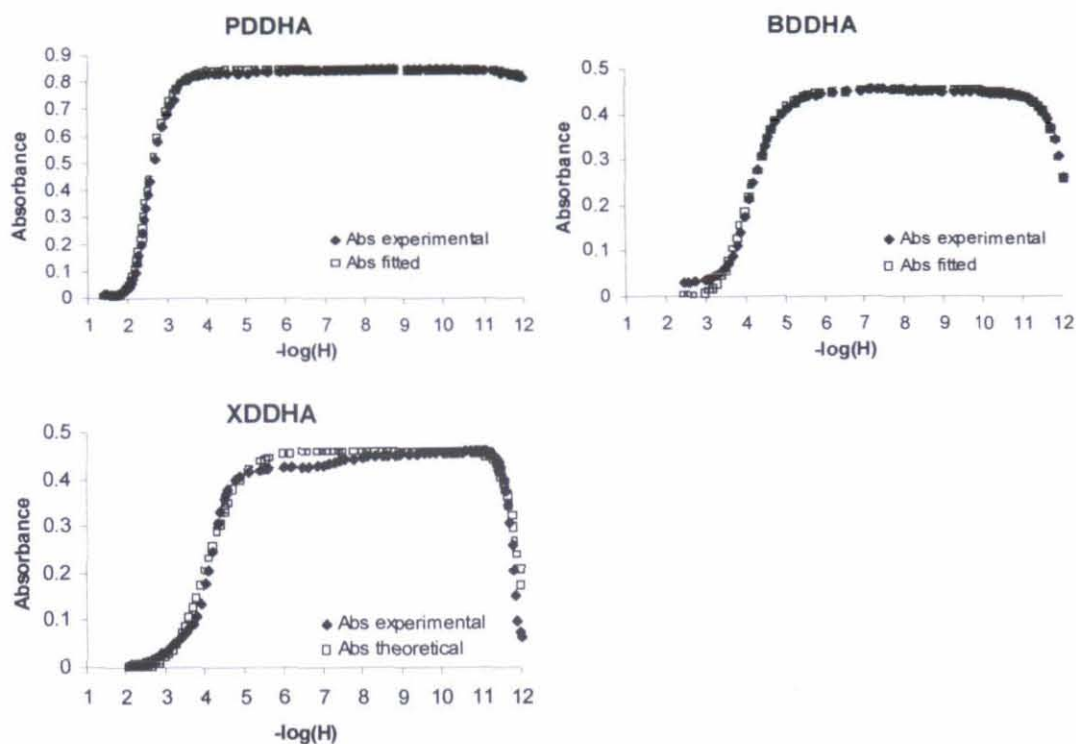
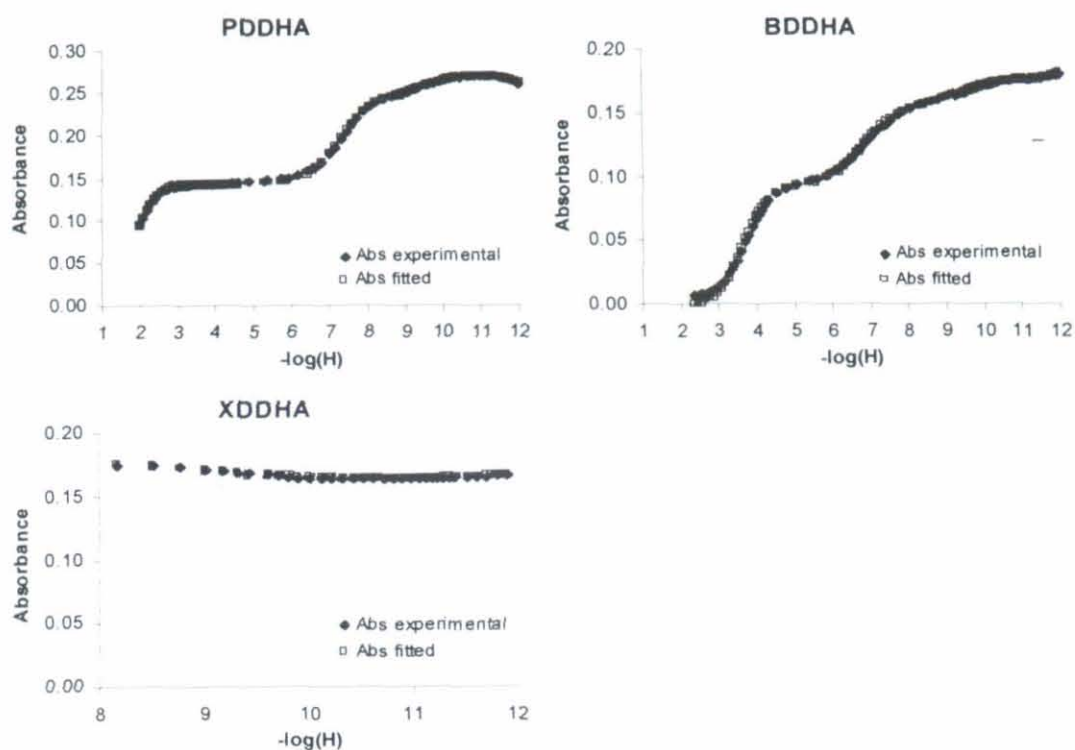


Figure 5.6. Plot Absorbance versus pH of the Copper(II) chelates at 650 nm. [PDDHA] = $9.54 \cdot 10^{-4} \text{M}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 1.093 \cdot 10^{-3} \text{M}$; [BDDHA] = $47.10 \cdot 10^{-4} \text{M}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 7.17 \cdot 10^{-4} \text{M}$; [XDDHA] = $8.28 \cdot 10^{-4} \text{M}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 8.31 \cdot 10^{-4} \text{M}$.



Ligand	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9	9.5	10	10.5	11	11.5	12
EDDHA ^b	12.6	14.6	16.6	18.5	20.4	22.1	23.7	25.2	26.7	28.0	29.3	30.3	31.3	32.3	33.1	33.8	34.5
PDDHA	9.4	11.4	13.4	15.4	17.4	19.3	21.2	22.8	24.4	25.8	27.1	28.2	29.2	30.2	31.1	31.8	32.5
BDDHA	5.9	7.7	9.7	11.6	13.6	15.6	17.5	19.3	20.9	22.4	23.7	24.8	25.8	26.8	27.8	28.7	29.5
XDDHA	7.5	9.3	11.2	13.2	15.1	17.0	18.8	20.4	21.9	23.3	24.4	25.5	26.5	27.4	28.1	28.7	28.9

^aCalculated for $[L^+] = 1.1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $[M^+] = 1.0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. ^bYunta et al., 2003

Table 5.9. pCu^a vs pH for Cu²⁺ chelates

Ligand	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9	9.5	10	10.5	11	11.5	12
EDDHA ^b	6.9	8.0	9.2	10.6	11.9	13.2	14.3	15.5	16.8	18.1	19.3	20.4	21.4	22.3	23.0	23.5	23.9
PDDHA	5.2	6.3	7.5	8.8	10.3	11.7	13.1	14.3	15.6	16.8	18.0	19.1	20.2	21.1	21.9	22.6	23.0
BDDHA	3.3	4.3	5.3	6.3	7.4	8.5	9.7	10.9	12.0	13.0	13.9	14.7	15.6	16.5	17.3	17.8	18.2
XDDHA	-0.4	1.1	2.6	4.1	5.6	7.0	8.3	9.4	10.4	11.3	12.2	13.0	13.9	14.8	15.5	16.1	16.3

^aCalculated for $[L^+] = 1.1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $[M^+] = 1.0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. ^bYunta et al., 2003

CAPÍTULO 6

THEORETICAL SPECIATION OF ETHYLENEDIAMINE-N(*o*-
HYDROXYPHENYLACETIC)-N' (*p*-HYDROXYPHENYLACETIC)
ACID (*o,p*-EDDHA) IN AGRONOMIC CONDITIONS.

6. Theoretical speciation of Ethylenediamine-N(o-hydroxyphenylacetic)-N'-(p-hydroxyphenylacetic) acid (o,p-EDDHA) in agronomic conditions	pág
6.1. ABSTRACT	133
6.2. INTRODUCTION	133
6.3. MATERIALS AND METHODS	136
6.3.1. General	136
6.3.2. Complexing Capacity	136
6.3.3. Protonation Constants	137
6.3.4. Ca and Mg stability constants	138
6.3.5. Cu ²⁺ and Fe ³⁺ stability constants	138
6.3.6. pM values	139
6.3.7. Speciation Distribution	140
6.4. RESULTS AND DISCUSSION	141

6. Theoretical speciation *o,p*-EDDHA

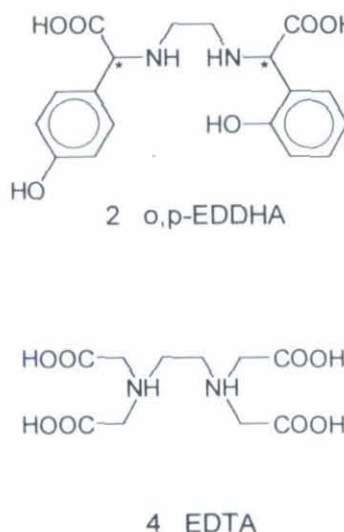
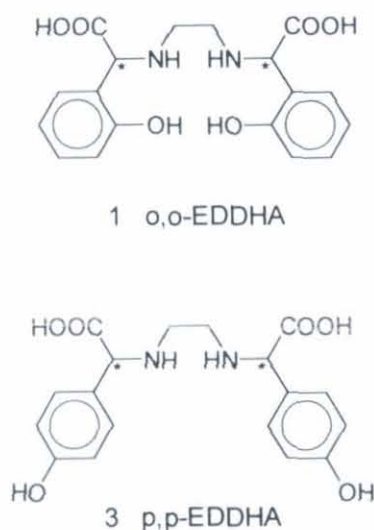
6.4.1. Complexing Capacity	141
6.4.2. Protonation and Ca^{2+} and Mg^{2+} Stability Constants	142
6.4.3. Cu^{2+} and Fe^{3+} Stability Constants	145
6.4.4. pM values	148
6.4.5. Species Distribution in Agronomic Conditions	148
6.5. SUPPORTING INFORMATION	150

6.1. ABSTRACT

The presence of ethylenediamine-*N*-(*o*-hydroxyphenylacetic)-*N'*-(*p*-hydroxyphenylacetic) acid (*o,p*-EDDHA) as the second largest component in commercial EDDHA iron chelates has recently been demonstrated. Here we report the speciation of *o,p*-EDDHA applying a novel methodology through the determination of the complexing capacity, protonation, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+} stability constants. The pM values and species distribution in solution, hydroponic and soil conditions were obtained. Due to the para position of one phenol group in *o,p*-EDDHA, the protonation constants and Ca and Mg stability constants have different values than those of *o,o*-EDDHA and *p,p*-EDDHA regioisomers. *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} stability constants are higher than those of EDTA/ Fe^{3+} but lower than those of *o,o*-EDDHA/ Fe^{3+} . The sequence obtained for pFe is *o,o*-EDDHA/ $\text{Fe}^{3+} \geq o,p$ -EDDHA/ $\text{Fe}^{3+} > \text{EDTA}/\text{Fe}^{3+}$. *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} can be used as an iron chelate in hydroponic conditions. Also it can be used in soils with limited Cu availability.

6.2. INTRODUCTION

Iron chlorosis is a nutritional disorder in plants that affects their development



and decreases the yield of many crops growing on calcareous soils. Chlorosis results in a decrease in the amount of chlorophyll and is manifested by a gradual disappearance of the green color of the plants (Mengel et al., 2001; Chen and Barak, 1982). Today, fertilization with

Figure 6.1. Chelating agents and chelates described in the text. *Chiral Carbons

synthetic iron chelates is the most common agricultural practice to relieve this problem.

6. Theoretical speciation *o,p*-EDDHA

In Europe, the 98/3/EC directive regulates iron and other micronutrient chelates used as they are or incorporated in mixed fertilizers. Six chelating agents, all polyamine-carboxylic acids, are permitted for this purpose: EDTA, DTPA, HEDTA, EDDHA, EDDH4MA and EDDCHA, but in the new regulation proposed by the EC, *o,p*-EDDHA is also included. Ethylenediamine-*N,N'*-di(*o*-hydroxy-phenyl)acetic (*o,o*-EDDHA) (1 in Figure 6.1) and their analogues are among the most efficient iron chelating agents used (Norvell, 1991). They have two phenolic groups replacing two of the carboxylates of EDTA; which increases the stability of the iron chelate by more than 10^{10} (Åhrland et al., 1990). Therefore, EDTA and their analogues (4 in Figure 6.1) are weaker than EDDHA and their analogues and their use is restricted to neutral soils or to hydroponic-like cultures (Chen and Barak, 1982). The synthesis of *o,o*-EDDHA (1 in Figure 6.1), originally reported by Kroll et al (1957), is a Strecker reaction on the imine derived from ethylenediamine and salicylaldehyde. Although the procedure can be employed to obtain other symmetrically substituted EDDHAs (Frost and Freedman, 1959; Knell and Kroll, 1960), the drawback is the need for the liquid HCN during the industrial process. Other approaches to the synthesis of ethylenediamine-di(*o*-hydroxyphenyl)acetic acids are based on a Mannich-like reaction between phenol (or substituted phenols), ethylenediamine, and glyoxylic acid (Petree et al., 1978; Julien, and Aymand). This method is used for the preparation of all of the EDDHA currently in the market. Some analytical methods for the quality control of such products have been developed and employed in order to determine the *o,o*-EDDHA/ Fe^{3+} content in the product (Barak and Chen, 1987; EN 13368:2001-2; Deacon et al., 1994; Lucena et al. 1996). Other important aspects related to the composition of the commercial chelates has been neglected with these analytical methods. Actual industrial synthesis of *o,o*-EDDHA (Frost and Freedman, 1959; Knell and Kroll, 1960) produces a mixture of three regioisomeric products, namely, *o,o*-EDDHA, *o,p*-EDDHA and *p,p*-EDDHA (1, 2, and 3, respectively, in Figure 6.1) in variable amounts. In order to study the single components of this mixture and to know the ability to form ferric complexes, a general method for the synthesis of *o,o*-EDDHA, *p,p*-EDDHA (1, and 3, respectively, in Figure 6.1) has already been reported (Yunta et al. 2003). Also in our research, the characterization and equilibrium studies of the free ligands and their Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+} chelates, using a novel methodology, have been developed. It has been claimed that the second main component present in *o,o*-EDDHA commercial iron chelates is the *o,p*-EDDHA isomer (2 in Figure 6.1) (Hernández-Apaolaza, 1997; Cremonini et al., 2001). Two alternative routes for the

synthesis of *o,p*-EDDHA were developed (Gómez-Gallego et al., 2002). Furthermore, having obtained a pure sample of *o,p*-EDDHA we have been able to confirm unambiguously that *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} complex is actually present in considerable amounts in commercial samples of *o,o*-EDDHA iron chelates (Gómez-Gallego et al., 2002). When *p,p*-EDDHA was characterized and compared with its *o,o*-EDDHA regioisomer (Yunta et al., 2003), the relative position of the hydroxyl group into the benzene ring was revealed as a very important factor in the formation of the ferric complex. *p,p*-EDDHA/ Fe^{3+} does not form in aqueous solution because the two *para*-hydroxyphenyl groups are sterically impaired to bind Fe^{3+} (Yunta et al., 2003).

Several authors evaluate the stability, reactivity and sorption processes of the iron chelates with different soil components (peat, oxyhydroxides, calcium carbonate and clay minerals) and agronomic soils. Thus, Hernández-Apaolaza et al. (2001) reported that EDDHA/ Fe^{3+} chelate was more retained in acid peat than EDDH4MA/ Fe^{3+} but in montmorillonite, at low concentration, the retention of EDDH4MA/ Fe^{3+} is greater than the one of the EDDHA/ Fe^{3+} . *meso*-EDDHA/ Fe^{3+} isomer was the most retained. The absorption was very low for EDDH4MA/ Fe^{3+} isomers. EDDHA/ Fe^{3+} , EDDH4MA/ Fe^{3+} , EDDHSA/ Fe^{3+} and EDDCHA/ Fe^{3+} presented high stability in alkaline pHs and low reactivity with alkaline soils and soil components (Álvarez-Fernández et al., 1997). The presence of other secondary products such as *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} and *p,p*-EDDHA modified decisively the behavior of commercial containing EDDHA/ Fe^{3+} . In order to determine the stability of each secondary products in agronomic conditions its necessary to evaluate the reactivity using standards.

Chemical speciation is been profusely used in the mineral nutrition. Computerized chemical equilibrium models are powerful tools for studying the relations between chemical speciation and the uptake, transport, and function of elements (Loeppert et al., 1994). Halvorson and Lindsay (1972) developed computer programs to calculated the equilibrium levels of chelate metals in nutrient solutions and soils systems considering solid phases and the presence of oxides. This type of modelization has been already applied to study the stability of *o,o*-EDDHA/ Fe^{3+} chelate showing the good correlation with its behavior in agronomic conditions.

The aim of this research work is to study the binding capacity of *o,p*-EDDHA chelating agent. Thus, the following has been determined: chelating capacity, the formation constants, pM determination and the species distribution in nutrient solution and soil conditions.

6.3. MATERIALS AND METHODS

6.3.1. General

The methodology has been described elsewhere (Yunta et al., 2003). Potentiometric measurements were performed with a Metrohm 719 and/or 721 potentiometers (precision of 0.1 mV), a Metrohm combined pH glass electrode and an ion selective Cu^{2+} electrode. Photometric titrations were carried out using a Metrohm 662 photometer (resolution of $10 \text{ nm} \pm 0.1 \text{ nm}$) with a white light spectrode of path length $2 \times 10 \text{ mm}$. Both potentiometers were controlled by a TiNet 2.4 software program for PC.

All reagents used in this work were of analytical grade. All aqueous solutions were prepared with CO_2 -free, water type I grade (ASTM, 1995). CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl, NaOH, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, HCl and Fe^{3+} standard solution were obtained from Merck Chemical Co. A Gran's plot analysis was used to check for carbonate contamination of the standard aqueous NaOH and consistently revealed less than 0.5% of carbonate (Gran, 1952). The $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ solution was standardized with $\text{Na}_2\text{-H}_2\text{EDTA}$ salt solution by potentiometric titration. The end point of all potentiometric titrations were determined by the Gran's function (Gran, 1952). Fe^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} and Cu^{2+} solutions were standardized by Atomic Absorption Spectroscopy with a Perkin Elmer Analyst 800 spectrophotometer. All titrations were made under inert atmosphere (99.9995 purity grade N_2 , NaOH washed, 0.100 NaCl saturated). All commercially available organic reagents were used without further purification. *o,p*-EDDHA (2 in Figure 6.1) was supplied by Syngenta Crop Protection.

6.3.2. Complexing Capacity

o,p-EDDHA was characterized by spectroscopic techniques. ^1H NMR spectra was kindly provided by Dr. Sierra group and recorded on a Bruker 200-AC (200.13 MHz for ^1H) spectrometer.

The complexing capacity of the *o,p*-EDDHA ligand has been determined using both photometric (with Fe^{3+} solution as titrant) and potentiometric (with Cu^{2+} solution as titrant) methods (Gómez-Gallego et al., 2002). The titrations were carried out at 25.0 ± 0.5 °C and the ionic strength was fixed at 0.1 M with NaCl. The concentrations of the chelating agent solutions were approximately $1 \cdot 10^{-4}$ M.

The end points of the photometric titrations were determined by both linear segments' intersection (Willard et al., 1988) and the smoothed second derivative method (Savitzky and Golay, 1964). The Fe^{3+} solution ($4.47 \cdot 10^{-4}$ M) used as a titrant. pH was fixed at 6.0 with 2mM MES and was maintained at this pH during the titration with NaOH solution. The *o,p*-EDDHA molar absorptivity was also obtained at 480nm.

The end points of the potentiometric titration of *o,p*-EDDHA with Cu^{2+} were determined by both Gran's function (Gran, 1952) and the first derivative method. The Cu^{2+} solution ($5.062 \cdot 10^{-4}$ M) used as a titrant solution. A Cu^{2+} selective electrode with reference electrode was used to measure Cu^{2+} free cation concentration. The photometric and potentiometric curves as well as the determination of the end points are showed in Figure 6.7 in Supporting Information.

6.3.3. Protonation Constants

The protonation constants have been determined by both photometric and potentiometric methods. The first two association steps of the ligand were measured spectrophotometrically (L'Eplattenier et al., 1967), since the combination of protons with the phenolic groups are accompanied by extensive changes in the absorption spectra (at 295 nm). Twelve $1 \cdot 10^{-4}$ M solutions were prepared with the ionic strength adjusted to 0.100M with NaCl and pH adjusted from 8.20 to 13.30 with 0.3-0.5 pH intervals. 250 - 500 nm spectra were obtained in a Shimadzu UV-VIS spectrophotometer. The wavelength on the maximum absorbance and molar absorptivities of L^{4-} and LH_2^{2-} species were initially estimated at pH 13.5 and 9 respectively and used as seeds for the following

calculations. The calculations themselves involved a least-squares minimization of calculated versus observed absorbances varying the first and second protonation constants and the molar absorptivities (Yunta et al., 2003).

The lowest protonation constants, corresponding to the two amino groups and two carboxylic groups were determined by potentiometric titration (Martell and Motekaitis, 1992). *o,p*-EDDHA chelating agent solution ($1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $\mu=0.1 \text{ M}$ (NaCl)), previously dissolved in four equivalents of NaOH per equivalent of chelating agent, was back-titrated with HCl (0.05009 ± 0.00005) M solution at 25°C under N_2 atmosphere. The third through sixth ligand protonation constants were calculated using the FORTRAN program BEST (Motekaitis and Martell, 1982).

6.3.4. Ca^{2+} and Mg^{2+} stability constants

The methodology used for protonation constants was also applied to determine the Ca^{2+} and Mg^{2+} stability constants. *o,p*-EDDHA/ Ca^{2+} and *o,p*-EDDHA/ Mg^{2+} chelates in 1:1 and 1:10 rates were previously formed and then were back-titrated with HCl (0.05009 ± 0.00005) M solution at 25°C under N_2 atmosphere.

Total Ca^{2+} and Mg^{2+} concentrations were measured by Atomic Absorption Spectrophotometry. The Ca^{2+} and Mg^{2+} stability constants were calculated using the FORTRAN program BEST (Martell and Motekaitis, 1992).

6.3.5. Cu^{2+} and Fe^{3+} stability constants

Previous to the determination of their stability constants, studies of the *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} and *o,p*-EDDHA/ Cu^{2+} absorption spectrum were carried out in order to choose the wavelength adequate to run the photometric titrations. Twelve solutions covering a pH range 2-12 were prepared to be $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ on iron chelate or $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ on copper chelate, and the spectra between 350-800 nm were obtained in 10 nm intervals.

Stability constants for the Fe^{3+} and Cu^{2+} chelates were calculated from spectrophotometric data obtained after base titration (Yunta et al., 2003). Four or six equivalents of standard base (0.200 M) were added to the chelating agent and then the

ionic strength was maintained at 0.100 M with reagent-grade NaCl. Solutions of Fe^{3+} and Cu^{2+} chelates (1:1 metal:ligand ratio) were prepared under N_2 at $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$, by slow addition of Fe^{3+} or Cu^{2+} standard solutions.

When the *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} was formed, hydrochloric acid was added until the solution was colorless. The experimental solution was diluted to 500 mL with type I water (ASTM, 1995) to be $1 \cdot 10^{-4}$ M on iron chelate. 60 mL were placed in a 150-ml thermostated jacketed reaction vessel, and then titrated with aqueous 0.200 M NaOH titrant to pH 12. The absorbance of the solution was measured at 480 nm at each 0.05-0.1 pH interval, depending on the curve zone.

For the Cu^{2+} -chelate, the pH was raised until 12 by the addition of NaOH. The experimental solution was diluted to 500 mL with type I water (ASTM, 1995) to be $1 \cdot 10^{-3}$ M on *o,p*-EDDHA/ Cu^{2+} . 25 mL of the experimental solution were titrated with aqueous 0.200 M HCl titrant until the solution was colorless or precipitation was observed. The absorbance of the solution was measured at 650 nm at 0.05-0.1 pH intervals, depending on the curve zone.

The stability constants (K_{FeL} , K_{FeHL} , $K_{\text{Fe(OH)L}}$, K_{CuL} , K_{CuHL} and $K_{\text{CuH}_2\text{L}}$) were calculated from the data by an in-house program using Microsoft Excel Solver® utilizing mass balance and known equilibrium constant constraints while minimizing the least-squares absorbance fit to the observed spectral curves (Yunta et al., 2003).

6.3.6. pM values

A more reliable parameter for ligand effectiveness is the pM value, where $\text{pM} = -\log [\text{M}]$, which is similar to the "chemical potential" of the aquo metal ion. A comparison of the total sequestering ability of *o,p*-EDDHA ligand can be made through the determination of pFe and pCu values using two different models.

In the first model, the calculation of $[\text{M}]$, the concentration of free aquo metal ion was made taking account of only the proton affinities of the ligand and other chelate species such as protonated metal complexes, in accordance with Bannochie and Martell

(1991). These values were computed for pH range from 4.0 to 12.0, with ionic strength fixed at 0.100 M, using a 10 % excess of ligand.

In the second model, pM values were calculated in a nutrient solution system in order to obtain the total sequestering ability of *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} chelate in agronomic conditions. For this, both component and thermodynamic database of the equilibrium speciation model MINTEQA2 program were modified in order to include the *o,p*-EDDHA ligand and their protonation, and Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+} stability constants (Allison et al., 1990). *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} chelate was introduced in the Hoagland nutrient solution (Halvorson and Lindsay, 1972), of which the composition was; $\text{Fe}^{3+} = \text{Ligand} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $\text{Cu}^{2+} = 3.15 \cdot 10^{-7} \text{ M}$; $\text{Ca}^{2+} = 1.6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $\text{Mg}^{2+} = 8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $\text{Zn}^{2+} = 1.54 \cdot 10^{-6} \text{ M}$; $\text{Mn}^{2+} = 4.36 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. pFe and pCu values were also calculated for *o,o*-EDDHA, *p,p*-EDDHA and EDTA chelating agents using the two models. EDTA/ Zn^{2+} and EDTA/ Mn^{2+} chelates have been considered for pM and speciation distribution determinations. However, *o,o*-EDDHA/ Zn^{2+} and *o,o*-EDDHA/ Mn^{2+} chelates do not form in the presence of Fe^{3+} and do not affect pM and speciation distribution, so they were not included in either system (Allison et al., 1990).

6.3.7. Speciation Distribution

The *o,p*-EDDHA species distribution at pH range 4-13 were determined into three theoretical models considering their agronomic use: in solution, in hydroponic culture and in soil conditions respectively.

The first model is used to determine the behavior of *o,p*-EDDHA in solution conditions. Species distribution were made using the same methodology as that used to calculate pFe in agronomic conditions (second model for the determination of pFe).

The second model is used to determine the behavior of *o,p*-EDDHA in hydroponic conditions. In this case Hoagland nutrient solution was also used but $\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{amorp})$ equilibrium was introduced in the system as a solubility controller.

The third model is used to determine the behavior of *o,p*-EDDHA in soil conditions. In order to predict the distribution of the *o,p*-EDDHA species in soils, it is necessary to use a theoretical model where all soil components that could have some effect on *o,p*-

EDDHA/ Fe^{3+} stability were considered. Due to the competition observed between Fe^{3+} and Cu^{2+} for *o,p*-EDDHA, two soil types with unlimited and limited Cu^{2+} availability respectively were proposed in order to predict the stability of *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} with high and low Cu^{2+} levels in soil respectively.

Similarly, *o,o*-EDDHA, *p,p*-EDDHA and EDTA species distribution were determined for the three models.

6.4. RESULTS AND DISCUSSION

6.4.1. Complexing Capacity

NMR spectra of the *o,p*-EDDHA sample presents a high purity degree. CH groups of the *ortho* system are located very close to those corresponding to the *o,o*-EDDHA (4,24 ppm) and the CH groups of the *para* system close to those of the *p,p*-EDDHA (3,5 ppm). In the aromatic system the *para* and *ortho* systems are well separated.

No significant differences were found when the titrimetric purity of the synthetic *o,p*-EDDHA, obtained by photometric titration with Fe^{3+} solution (95.4 ± 2.0 %), was compared with the potentiometric titration with Cu^{2+} solution (94.1 ± 1.2 %). The end points for each titration were determined using the two methods described in the experimental section in order to include their own analytical errors into the mean value (94.7 ± 1.1 %). Since *o,p*-EDDHA is highly pure, and the photometric and potentiometric plots are very clean, this product may be used in HPLC method (Lucena et al., 1996) as standard compound to quantify the presence of this ligand in commercial brands.

The use of spectrophotometric and potentiometric titrations as complementary tool to determine of the purity of the phenolic chelating agents have been already profusely discussed in a earlier research work (Yunta et al., 2003). We concluded that this analytical determination is adequate to quantify the complexing capacity independently of the presence of small amounts of impurities produced in the synthesis pathways which not form colored complexes.

The molar absorptivity (ϵ) of *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} can be easily determined from the photometric plot (see 6.7.1.A in Figure 6.7.) at 480 nm. This molar absorptivity ($2129 \pm 53 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) is very close to that published recently corresponding an other *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} chelate ($2130 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Gómez-Gallego et al., 2002). These values are almost half of the ϵ obtained for the *o,o*-EDDHA/ Fe^{3+} chelate at the same wavelength ($4721 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Yunta et al. 2003) and using the same methodology. At 480 nm, the light is being absorbed by the Fe-phenolate bond and there are two of these bonds in the structure of the *o,o*-EDDHA/ Fe^{3+} complex (1 in Figure 6.1). The value of ϵ obtained for the *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} is consistent with a structure in which only one Fe-phenolate is present. This explanation is very useful in understanding why no *p,p*-EDDHA/ Fe^{3+} is formed.

6.4.2. Protonation and Ca^{2+} and Mg^{2+} Stability Constants

The absorption band maximum at 291 nm has been considered adequate for the determination of the first two phenolate protonations, K_1^H and K_2^H , of *o,p*-EDDHA. The wavelength maxima is chosen using the spectroscopic equilibrium curves (see Figure 6.8 in Supporting Information). Due to the low value obtained for K_2^H , this constant was also refined with the other protonation constants calculated by potentiometric method (see Figure 6.9 in Supporting Information) using BEST.

The protonation constants obtained are shown in Table 6.1. These values are compared with those of *o,o*-EDDHA and *p,p*-EDDHA (1 and 3 in Figure 6.1) obtained in an earlier work using the same methodology (Yunta et al. 2003). Although the three regioisomers have the same functional groups, the relative position of the phenolic groups produce significant differences between their highest protonation constants. So, two intramolecular interactions in *o*-hydroxyphenyl-glycine (in *o,o*-EDDHA) involves the formation of two hydrogen bonds between the basic nitrogens and the phenolic groups. No intramolecular interactions occur when both functional groups are too apart to bind (*p*-hydroxyphenyl-glycine in *p,p*-EDDHA) and, therefore, their protonation constants are very close to that of phenol ($\text{pK}_a = 10.00$) (Yunta et al. 2003). On the other hand, the molar absorptivity of $[\text{o,p-EDDHA-H}]^{3-}$ species ($\epsilon_{\text{max}} = 3567 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 291 nm) is close to

that obtained for the L^{3-} species of the ligand [N-(2-hydroxybenzyl)-N'-benzylethylenediamine-N,N'-diacetic acid] (named L3 by the authors) ($\epsilon_{\max} = 3500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 292 nm) corresponding also to the phenolic deprotonation (Serratice et al., 2001). In the case of *o,p*-EDDHA, only one intramolecular interaction in *o*-hydroxyphenyl-glycine occurs, corresponding to the highest protonation constant. However, as no intramolecular interactions occur in the second protonation constants, its value is very close to that of *p,p*-EDDHA. No differences are found when protonation constants of the amine groups of *o,o*-EDDHA and *o,p*-EDDHA are compared because the intramolecular interactions are affecting the other protonation constants. No dissociation constants of carboxylic groups from *o,o*-EDDHA and *p,p*-EDDHA can be determined because the chelating agent below pH 5 precipitated (Bannochie and Martell, 1989). However, since no precipitation is observed in *o,p*-EDDHA, the two lowest protonation constants can be determined. Although, the species formed are predominant at very low pH and they are almost negligible at agronomic pHs.

Table 6.1. log Protonation Constants^a for *o,o*-EDDHA, *o,p*-EDDHA and *p,p*-EDDHA. (\pm indicate the confident limit for 95% from three replicates)

Quotient	<i>o,p</i> -EDDHA	^b <i>o,o</i> -EDDHA	^b <i>p,p</i> -EDDHA
$[LH^{3-}]/[H^+]\cdot[L^{4-}] \Rightarrow K_1^H$	11.18	11.94	9.94 ± 0.04
$[LH_2^{2-}]/[H^+]\cdot[LH^{3-}] \Rightarrow K_2^H$	10.18 ± 0.04	10.73	9.07 ± 0.02
$[LH_3^{-}]/[H^+]\cdot[LH_2^{2-}] \Rightarrow K_3^H$	8.65 ± 0.05	8.66 ± 0.04	6.85 ± 0.06
$[LH_4]/[H^+]\cdot[LH_3^{-}] \Rightarrow K_4^H$	6.19 ± 0.02	6.18 ± 0.06	4.36 ± 0.07
$[LH_5^{+}]/[H^+]\cdot[LH_4] \Rightarrow K_5^H$	2.57 ± 0.02	-	-
$[LH_6^{2+}]/[H^+]\cdot[LH_5^{+}] \Rightarrow K_6^H$	1.49 ± 0.07	-	-

^a $\mu = 0.1 \text{ M}$ (NaCl); $t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. ^b(Yunta et al. 2003)

Potentiometric titration curves for the *o,p*-EDDHA and their [1:1] and [10:1] metal:ligand pH profiles with Ca^{2+} and Mg^{2+} are shown in Figure 6.9 in Supporting Information. These data were analysed using the FORTRAN program BEST (Martell and Motekaitis, 1992) to obtain the *o,p*-EDDHA/ Ca^{2+} and *o,p*-EDDHA/ Mg^{2+} stability constants that are present in Table 6.2.

Table 6.2. Log Ca^{2+} and Mg^{2+} Stability Constants^a with *o,o*-EDDHA, *o,p*-EDDHA and *p,p*-EDDHA (\pm indicate the confident limit for 95% from three replicates)

Quotient	<i>o,p</i> -EDDHA	^b <i>o,o</i> -EDDHA	^b <i>p,p</i> -EDDHA
$[\text{CaL}^{2-}]/[\text{Ca}^{2+}] \cdot [\text{L}^{4-}]$	4.12 ± 0.10	7.29 ± 0.30	3.54 ± 0.52
$[\text{CaLH}^-]/[\text{Ca}^{2+}] \cdot [\text{H}^+] \cdot [\text{L}^{4-}]$	14.27 ± 0.16	16.77 ± 0.33	12.93 ± 0.58
$[\text{CaLH}_2]/[\text{Ca}^{2+}] \cdot [\text{H}^+]^2 \cdot [\text{L}^{4-}]$	23.23 ± 0.32	25.95 ± 0.50	21.21 ± 0.65
$[\text{MgL}^{2-}]/[\text{Mg}^{2+}] \cdot [\text{L}^{4-}]$	5.64 ± 0.16	9.76 ± 0.05	3.74 ± 0.57
$[\text{MgLH}^-]/[\text{Mg}^{2+}] \cdot [\text{H}^+] \cdot [\text{L}^{4-}]$	15.55 ± 0.03	18.18 ± 0.15	12.89 ± 0.39
$[\text{MgLH}_2]/[\text{Mg}^{2+}] \cdot [\text{H}^+]^2 \cdot [\text{L}^{4-}]$	23.83 ± 0.32	25.36 ± 0.24	20.79 ± 0.57

^a $\mu = 0.1 \text{ M}$ (NaCl); $\dagger = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. ^b(Yunta et al. 2003)

These values are compared with those of *o,o*-EDDHA and *p,p*-EDDHA. From the Ca and Mg^{2+} potentiometric curves, the presence of at least three species of the metal chelates MH_2L , MHL^- and ML^{2-} (see Figure 6.9 in Supporting Information) may be assumed. If the most stable ML^{2-} species are compared, *o,p*-EDDHA/ Mg^{2+} stability constants are higher than those of *o,p*-EDDHA/ Ca^{2+} . This fact is also observed for *o,o*-EDDHA and *p,p*-EDDHA and it is in strong agreement with other phenolic ligands analogous to *o,o*-EDDHA where the presence of phenolate groups favor the binding to small metals (e.g. Mg^{2+} (Yunta et al. 2003). *p,p*-EDDHA and *o,p*-EDDHA form weaker Ca^{2+} and Mg^{2+} chelates than *o,o*-EDDHA. $[\text{o,o-EDDHA-Metal}]^{2-}$ species involves the coordination to the ethylenediamine nitrogens and the phenolate groups. However, when $[\text{o,o-EDDHAH}_2\text{-Metal}]^0$ is formed, the metal is bonded to the ethylenediamine nitrogens and the carboxylate oxygens. The $[\text{o,o-EDDHAH-Metal}]^-$ involves the coordination to the ethylenediamine nitrogens, one phenolate group and one carboxylate oxygen. In *o,p*-EDDHA, ML^{2-} species is less stable than in *o,o*-EDDHA due to the *para*- position of one hydroxyphenyl which cannot bind metal effectively (2 in Figure 6.1). In order to prove this fact, if Ca^{2+} and Mg^{2+} stability constants are compared in function of their species ($[\text{MHL}^-]/[\text{M}]^{2+} \cdot [\text{HL}]^{3-}$) and taking into account the protonation constant of the species involved, the differences between MHL^- and ML^{2-} are lower for *o,p*-EDDHA (1.03 for

Ca^{2+} ; 1.27 for Mg^{2+}) and *p,p*-EDDHA (0.55 for Ca^{2+} ; 0.79 for Mg^{2+}) than for *o,o*-EDDHA (2.46 for Ca^{2+} ; 3.52 for Mg^{2+}). This implies that the MLH^- species is more important for *o,p*-EDDHA and *p,p*-EDDHA than for *o,o*-EDDHA for Ca^{2+} and Mg^{2+} systems.

6.4.3. Cu^{2+} and Fe^{3+} Stability Constants

Optical absorption spectra for both *o,p*-EDDHA/ Cu^{2+} and *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} are

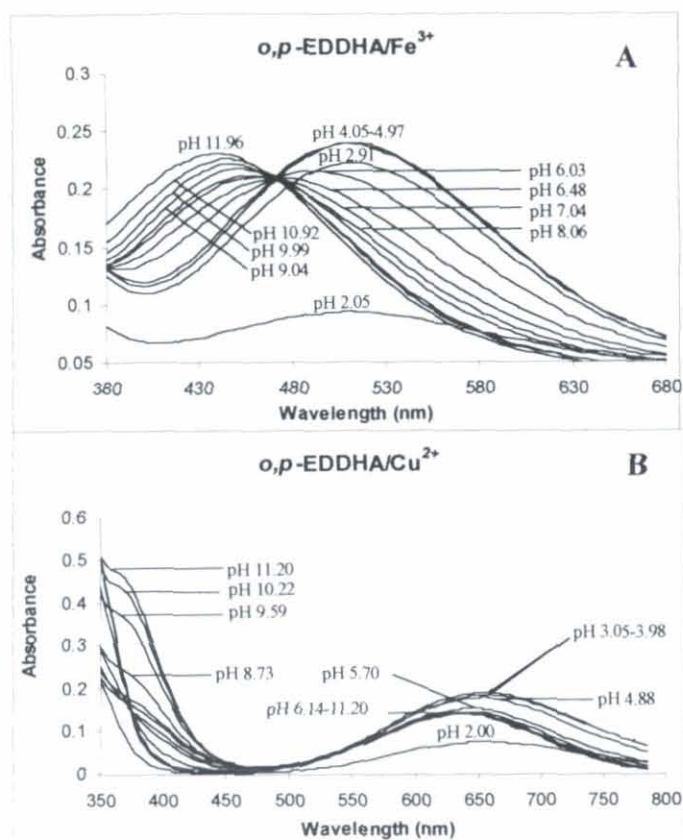


Figure 6.2. Absorption spectra of (A) *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} and (B) *o,p*-EDDHA/ Cu^{2+} as a function of p(H). [*o,p*-EDDHA/ Fe^{3+}] = $1 \cdot 10^{-4}$ M; and [*o,p*-EDDHA/ Cu^{2+}] = $1 \cdot 10^{-3}$ M. $t=25^\circ\text{C}$; $\mu=0.100$ M (NaCl).

transfer transition at pH 1.8.

However, the UV/Vis spectra for *o,p*-EDDHA/ Cu^{2+} presents the same trend as that of *o,o*-EDDHA/ Cu^{2+} (Frost et al., 1958; Bannochie and Martell, 1989) and *o,o*-EDDHSA/ Cu^{2+} system (Yunta et al. 2003). At pH below 6 the *o,p*-EDDHA/ Cu^{2+} has the

shown in Figure 6.2. While the absorbance maximum of the *o,o*-EDDHA/ Fe^{3+} is constant at 480 nm throughout the pH range (Bannochie and Martell, 1989), the *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} complex reveals a shift from 520 nm at pH 4.05 to 440 nm at pH 11.96. In addition, when the pH increased from 6.5 to 11.96, the spectra showed an isosbestic point at 470 nm, indicating that there are only two species with a different absorption in this pH range (see A in Figure 6.2). The same tendency is observed when the UV/Vis spectrum was made for L3 (ligand analogue to *o,p*-EDDHA) (Serratice et al., 2001), that showed a maximum at 525 nm that is attributed to a phenolate-to- Fe^{3+} charge

6. Theoretical speciation *o,p*-EDDHA

typical deep blue colour normally associated with Cu^{2+} -amino acid chelates, characterized by a broad absorption band at about 645 nm. As the pH is increased above 6, a second and much stronger band appears at 375 nm, the intensity of which increases with increasing pH (see B in Figure 6.2). It seems that this new band must be due to a resonating system involving the metal-phenolate linkages. Since only one copper-phenolate bond is formed for *o,p*-EDDHA/ Cu^{2+} no absorption maxima is found at 375 nm.

Fe^{3+} stability constants were determined using the absorption bands at 480 nm. The curves were also determined at 530 nm and 450 nm, as absorption maxima of *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} at acid and alkaline pHs respectively, in order to detect more clearly the change of the predominant species (see A, B and C in Figure 6.10 in Supporting Information). Cu^{2+} stability constants were determined using photometric curves at 650 nm, (see D in Figure 6.10 in Supporting Information) (Yunta et al. 2003). The Fe^{3+} and Cu^{2+} stability constants are shown in Table 6.3.

Table 6.3. log Stability constants^a for Cu^{2+} and Fe^{3+} Chelates.

Quotient	^a <i>o,p</i> -EDDHA	^b <i>o,o</i> -EDDHA	^b <i>p,p</i> -EDDHA
$[\text{FeL}]/[\text{Fe}^{3+}] \cdot [\text{L}^{4-}]$	28.72 ± 0.05	35.09 ± 0.28	-
$[\text{FeHL}]/[\text{Fe}^{3+}] \cdot [\text{L}^{4-}] \cdot [\text{H}^+]$	35.02 ± 0.05	36.89 ± 0.21	-
$[\text{FeH}_2\text{L}]/[\text{Fe}^{3+}] \cdot [\text{L}^{4-}] \cdot [\text{H}^+]^2$	37.35 ± 0.10	-	-
$[\text{FeOHL}^{2-}]/[\text{Fe}^{3+}] \cdot [\text{L}^{4-}] \cdot [\text{OH}^-]$	19.45 ± 0.19	23.66 ± 0.27	-
$[\text{CuL}^{2-}]/[\text{Cu}^{2+}] \cdot [\text{L}^{4-}]$	21.74 ± 0.38	25.13 ± 0.00	14.74 ± 0.06
$[\text{CuHL}]/[\text{Cu}^{2+}] \cdot [\text{L}^{4-}] \cdot [\text{H}^+]$	30.96 ± 0.09	32.61 ± 0.01	22.39 ± 0.06
$[\text{CuH}_2\text{L}]/[\text{Cu}^{2+}] \cdot [\text{L}^{4-}] \cdot [\text{H}^+]^2$	36.17 ± 0.12	37.31 ± 0.01	28.50 ± 0.04
$[\text{CuH}_3\text{L}]/[\text{Cu}^{2+}] \cdot [\text{L}^{4-}] \cdot [\text{H}^+]^3$	38.14 ± 0.07	-	31.09 ± 0.04

^a $\mu = 0.1 \text{ M}$ (NaCl); $\dagger = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. ^b(Yunta et al. 2003)

These stability constants were compared with those of *o,o*-EDDHA and *p,p*-EDDHA. Since Fe^{3+} is octahedrally coordinated; *o,o*-EDDHA has 6 donor groups able to occupy the 6 positions. [*o,o*-EDDHA/ Fe] species is the predominant one in a wide pH range (1.80 to 11.43). However in the *o,p*-EDDHA the position corresponding to the *para*-hydroxy phenolate does not bind the Fe^{3+} , and a water molecule occupies this vacant position.

The *para*-hydroxy phenolate takes a proton to form $\text{FeHL}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (5 in figure 6.3)

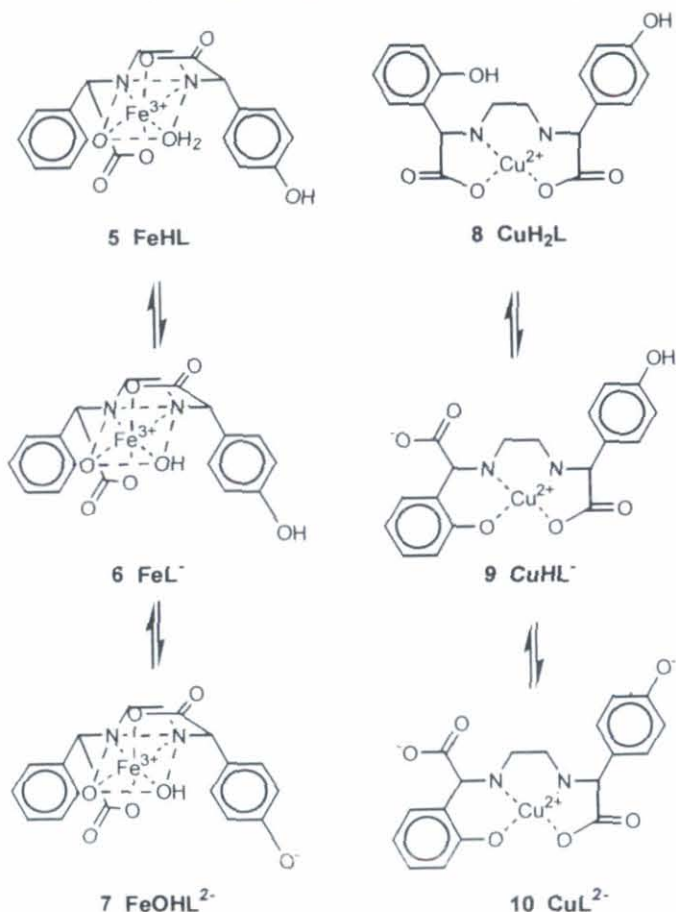


Figure 6.3. *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} and *o,p*-EDDHA/ Cu^{2+} species formed.

over an important pH range (up to 6.30). Over this pH a proton from the water can be released forming the FeL^- species (6 in figure 6.3) that is in fact $\text{Fe}(\text{LH})(\text{OH})^-$. At pH 9.27, the phenol dissociates to give the species FeLOH^{2-} (7 in figure 6.3). This pH value could be compared, although the Fe^{3+} binding can produce a larger acidity over the phenolate protonation, with the second protonation constant of *o,p*-EDDHA or with the two first protonation constants of *p,p*-EDDHA. The stronger binding of Fe^{3+} in *o,o*-EDDHA produces higher Fe^{3+} stability constants than *o,p*-EDDHA (Table 6.3). However, a higher Fe^{3+} ion affinity is observed for *o,p*-EDDHA than for EDTA ($\log K =$

25.10) and their analogues (Lindsay, 1979), despite that they have the 6 octahedral position occupied with the ligand. This is due to the high affinity between Fe^{3+} and the phenolate donor. Moreover, the [*o,p*-EDDHA/ Fe] stability constant agrees with that of the L3 ligand ($\log \text{FeL} = 27.00$) (Serraticce et al., 2001). This chelating agent is similar to

o,p-EDDHA lacking the hydroxy group in the para position. Therefore, based on the stability constants of the chelates, *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} could be used as ferric chelate better than EDTA/ Fe^{3+} for agronomic purposes.

For Cu^{2+} , the tendency is similar to that of Ca^{2+} and Mg^{2+} described above. In these chelates, Cu^{2+} have four main coordination positions in a square arrangement. *o,o*-EDDHA has the highest Cu^{2+} stability constant because it is able to complex copper with the two phenolate and two amine groups. However, in the [*o,p*-EDDHA/ Cu] $^-$ species, the metal is bonded to one carboxylate and one phenolate (see 10 in Figure 6.3). This is consistent with the relatively low absorption at 375 nm at high pHs for *o,p*-EDDHA/ Cu^{2+} (Figure 6.2), with respect to that of *o,o*-EDDHA/ Cu^{2+} that presents a maximum at this wavelength corresponding with the two Cu^{2+} phenolate bonds (Frost et al. 1958). The protonated and diprotonated species of *o,p*-EDDHA/ Cu^{2+} are similar to those of *o,o*-EDDHA/ Cu^{2+} described elsewhere (Yunta et al. 2003) because the copper involves the coordination with two amino groups and one or two carboxylate groups (see 9 and 8 in Figure 6.3 respectively).

6.4.4. pM values

The stability constants taken by themselves do not provide a comparable basis or measurement of the relative effectiveness of *o,p*-EDDHA in agronomic conditions. The different degrees of hydrogen ion and competing metals with the ferric and cupric ions for the ligands provide different metal affinities at a given pH. In fact, high affinities of strongly basic donor groups for metal ions are partially reversed by high affinities for hydrogen or competing metal ions. Figure 6.4 presents both pFe and pCu computed values from the first and second model described in its experimental section. pFe-3pH or pCu-2pH values instead of pFe or pCu are shown in order to have a better visualization of the comparison among chelates. For the first model, *o,o*-EDDHA is the most effective ligand to bind Fe^{3+} and Cu^{2+} at pH above 6 and 7.5 respectively (see A and B in Figure 6.4). *o,p*-EDDHA has a higher affinity by Fe^{3+} and Cu^{2+} than EDTA ligand at pH above 9.5 and 7.5 respectively; this is due to the presence of phenolate groups that provide a larger complexing ability at alkaline pHs. Due to the presence of two chiral carbons, *o,p*-EDDHA is formed by several geometric isomer forms (RR', RS', SR' and SS'), similarly to *o,o*-EDDHA (racemic mixture and meso isomer). The pFe determined for *o,p*-EDDHA is then

an average for the isomer forms. This has already been pointed out for several analogues ligands (EDDHA (Bannochie and Martell, 1989), EDDH4MA (Ahrland et al. 1990) and TMPHPG (Bannochie and Martell, 1991)). At agronomic pH of 7.5, the pFe value of *o,p*-EDDHA (20.2) is comparable to those of isomers of TMPHPG ligand (*rac*-TMPHPG = 22.0; *meso*-TMPHPG = 21.6) (Bannochie and Martell, 1991).

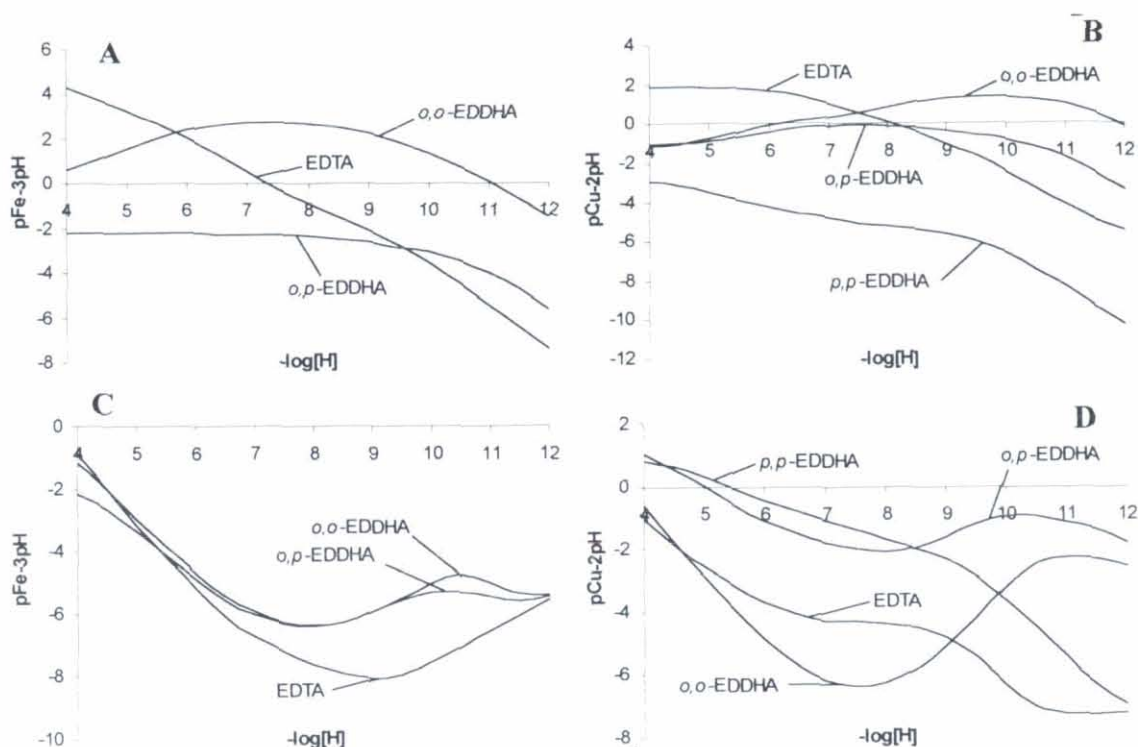


Figure 6.4. pFe (A and C) and pCu (B and D) values of several ligands against pH. In A and B, pFe and pCu have been determined according to the first model (considering only the proton affinities of the ligand and other chelate species such as protonated metal complexes (29). pH range from 4.0 to 12.0, ionic strength fixed at 0.100 M and using a 10 % excess of ligand). In C and D, pFe and pCu have been determined using the second model (iron chelates (10^{-4} M) were introduced in the Hoagland nutrient solution composition in the speciation model MINTEQA2 program (31)

Additionally, in order to compare the effectiveness of a ligand, the pFe/pCu ratio is a more reliable parameter than their values such as (Lindsay, 1979). When this parameter is applied to *o,o*-EDDHA and *o,p*-EDDHA it is predicted that Cu^{2+} was more effective in *o,p*-EDDHA than in *o,o*-EDDHA.

pFe^{3+} and pCu^{2+} are very useful in comparing the effectiveness of these ligands when they are applied in solution containing only one metal. However in agronomic uses, the iron chelates are used in systems where several other metals (i.e. Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} and so on) are present. The presence of those metals can modify the relative effectiveness of its iron chelate and, therefore, the pFe could vary. For this reason, a second model has been used in determining pFe and pCu values (see C and D in Figure 6.4). pFe values obtained for *o,o*-EDDHA and *o,p*-EDDHA are of the same magnitude and higher than those of EDTA ligand (see C in Figure 6.4). This is due to the larger competition of Ca^{2+} and Mg^{2+} for EDTA that produces the displacement of Fe^{3+} from the chelate and then the decrease of pFe . When pCu of *o,o*-EDDHA and *o,p*-EDDHA are compared, the tendency is similar to that found for pFe . *o,p*-EDDHA presents a higher effectiveness to bind Cu^{2+} than *o,o*-EDDHA, but the *p,p*-EDDHA presents the highest value around pH 8.0 (see D in Figure 6.4). This fact can be very important because in the case of commercial ferric chelates with large amounts of *o,p*-EDDHA and *p,p*-EDDHA, since no *p,p*-EDDHA/ Fe^{3+} is formed, the Cu^{2+} present in soil solution can be complexed by *p,p*-EDDHA and, therefore, Fe^{3+} can be complexed more effectively by *o,p*-EDDHA and *o,o*-EDDHA.

6.4.5. Species Distribution in Agronomic Conditions

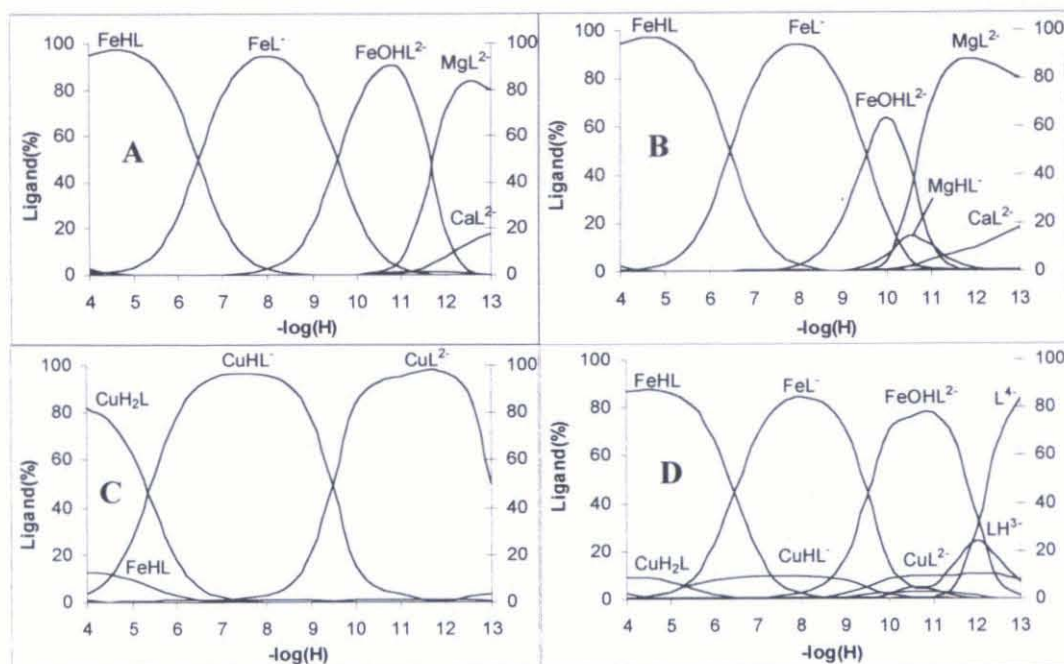


Figure 6.5. Distribution diagrams of the system *o,p*-EDDHA in: (A) solution; (B) nutrient solution; (C) soil with unlimited Cu^{2+} availability and; (D) limited Cu^{2+} availability.

The first model is shown in A in Figure 6.5, the distribution of the different species of *o,p*-EDDHA is in accordance with their stability constants. The species of *o,p*-EDDHAH_x/Fe³⁺ are the predominant species at agronomic pH. Only at pH above 11.5 the *o,p*-EDDHA/Mg²⁺ and *o,p*-EDDHA/Ca²⁺ species are important. When the second model is considered (nutrient solution; see B in Figure 6.5) the same tendency is found. Since precipitation of Fe(OH)₃(amorp) is allowed in this media, the presence of the FeOHL²⁻ species is reduced at high pHs. The stability is enough to maintain all the iron in solution at pH below 8.5, which is a normal limit for agronomic purposes. The *o,p*-EDDHA/Cu²⁺ is very low when compared with *o,p*-EDDHA/Fe³⁺ (see A and B in Figure 6.5) because the Cu²⁺ molar concentration (3.15·10⁻⁷) is lower than that of Fe³⁺ (1.00·10⁻⁴) in Hoagland nutrient solution. However, if the chelated Cu²⁺ among the three chelating agents (*o,p*-EDDHA, *o,o*-EDDHA and EDTA) is compared, *o,p*-EDDHA/Cu²⁺ is the most stable because almost 100% of the soluble Cu²⁺ remain chelated in all pH range (data not shown).

In Table 6.4 the soil model used with unlimited Cu²⁺ availability is described. In this

Component	Equilibrium	Log K ⁰
* Soil - Ca	Soil - Ca ⇌ Ca ²⁺	-2.50
* Soil - Mg	Soil - Mg ⇌ Mg ²⁺	-3.00
Soil - Cu	Soil - Cu + 2H ⁺ ⇌ Cu ²⁺	2.80
Soil - Fe	Soil - Fe + 3H ⁺ ⇌ Fe ³⁺ + 3H ₂ O	2.70
Soil - Zn	Soil - Zn + 2H ⁺ ⇌ Zn ²⁺	5.80
*These equilibriums were replaced at 7.5-13 pH range by the following:		
Calcite	CaCO ₃ ⇌ Ca ²⁺ + CO ₃ ²⁻	-8.41
Dolomite	CaMg(CO ₃) ₂ ⇌ Mg ²⁺ + Ca ²⁺ + 2CO ₃ ²⁻	-3.00

Table 6.4. Composition of theoretical soil model with unlimited Cu²⁺ availability used to predict the stability of *o,p*-EDDHA/Fe³⁺ in soil conditions. *o,p*-EDDHA, *o,o*-EDDHA and EDTA ligands are introduced with a total concentration of 100 μM. CO₂ is present at 0.0003 atm.

theoretical model the main components that can affect the iron chelate stability are included. Ca and Mg equilibriums are included in the soil model since these elements are considered the main competitors in calcareous conditions for weak chelating agents, as

EDTA (31). Depending on the pH zone, the predominant solid phases controlling Ca²⁺ and Mg²⁺ solubilities are different (Ca-soil and Mg-soil equilibriums at pH below 7.5 and calcite and dolomite equilibriums at pH over 7.5). Cu²⁺ equilibrium has been included in the

6. Theoretical speciation *o,p*-EDDHA

soil model in order to determine the ability of this metal to replace Fe^{3+} from *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} .

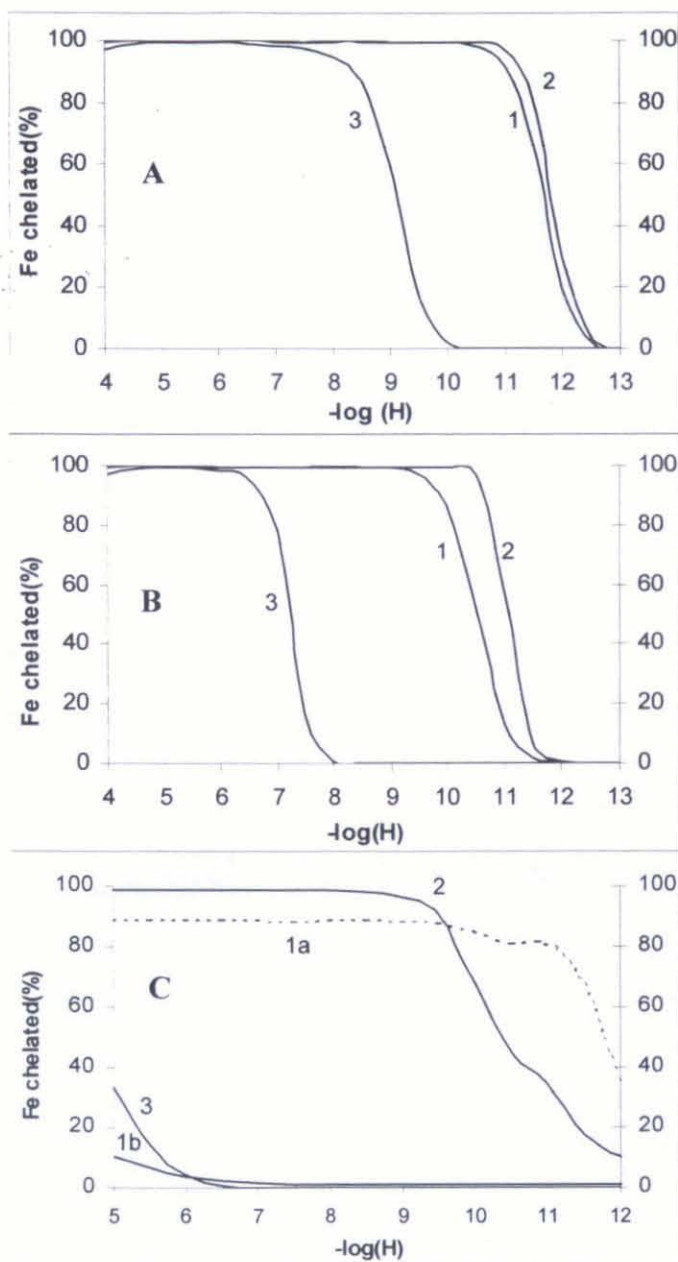


Figure 6.6. Percentage of chelating agents in solution that is binding Fe^{3+} . Comparison of the behavior of: (1) *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} ((1a) limited Cu^{2+} and; (1b) unlimited Cu^{2+}); (2) *o,o*-EDDHA/ Fe^{3+} ; (3) and EDTA/ Fe^{3+} in: (A) solution; (B) nutrient solution and; (C) soil conditions.

In this theoretical model, *o,p*-EDDHA/ Cu^{2+} is the chelate mainly formed instead of *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} (see C in Figure 6.5) despite the Fe^{3+} chelate formation constants are higher than the corresponding Cu^{2+} ones (see Table 6.3). This is due to the larger solubility of Cu^{2+} from the solid phase. Normally in calcareous soils, where iron chelates are frequently used, also present low Cu^{2+} availability. 10^{-4} M of Cu^{2+} in solution reached in the first model soil is very high and unusual in soils (only in soils contaminated by the addition of pesticide). Then, in the second model soil the total Cu^{2+} concentration in solution is limited at $1 \cdot 10^{-5}$ M. In this case, *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} chelate is the main chelate, although all Cu^{2+} is as *o,p*-EDDHA/ Cu^{2+} (see D in Figure 6.5).

Comparison between *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} , *o,o*-EDDHA/ Fe^{3+} and EDTA/ Fe^{3+} in solution, nutrient solution and soil conditions are shown in A, B, and

C respectively in Figure 6.6. The behavior of *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} is close to that of *o,o*-EDDHA/ Fe^{3+} in solution, hydroponic conditions, and soil with low Cu^{2+} level (see A, B, and C in Figure 6.6) because ferric chelate is the main component in agronomic conditions. EDTA maintain soluble Fe^{3+} in solution conditions and in hydroponic conditions at pH below 7.

In summary, the following can be deduced from our research: *o,p*-EDDHA provided by Syngenta Crop Protection is highly pure and is useful when used as standard to identify *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} from commercial products. Due to the para position of one phenol group in *o,p*-EDDHA, the protonation constants and Ca^{2+} and Mg^{2+} stability constants have different values than those of *o,o*-EDDHA and *p,p*-EDDHA regioisomers. Although *o,p*-EDDHA has only five functional groups which are able to complex Fe^{3+} ion, their *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} stability constants are higher than those of EDTA/ Fe^{3+} but lower than those of *o,o*-EDDHA/ Fe^{3+} . Stability order, measured through pFe value in solution using MINTEQA2 speciation program, in all normal agronomic pH was as follows; *o,o*-EDDHA/ $\text{Fe}^{3+} \geq o,p$ -EDDHA/ $\text{Fe}^{3+} > \text{EDTA}/\text{Fe}^{3+}$. In hydroponic conditions, *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} can be used as iron chelate because it is completely formed at normal agronomic pH. In soil conditions with limited Cu^{2+} availability *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} is stable, but when the soil presents large availability of Cu^{2+} , it can displace the Fe^{3+} from the chelate.

6.5. SUPPORTING INFORMATION

Figure 6.7. 6.7.1.A Spectrophotometric titration at 480nm of *o,p*-EDDHA chelating agent solution ($60\text{ml} \cdot 10^{-4}\text{M}$) with Fe^{3+} solution ($4.449 \cdot 10^{-4}\text{M}$) as titrant solution. 2.1.A end point determined by linear segments intersection method. 6.7.1.B end point determined by smoothed derivated second method. 2.2 Potentiometric titration of *o,p*-EDDHA chelating agent solution ($25\text{ml} \cdot 10^{-4}\text{M}$) with Cu^{2+} solution ($5.062 \cdot 10^{-4}\text{M}$) as titrant solution. 6.7.2.A end point determined by Gran's equation method. 6.7.2.B end point determined by first derivated method.

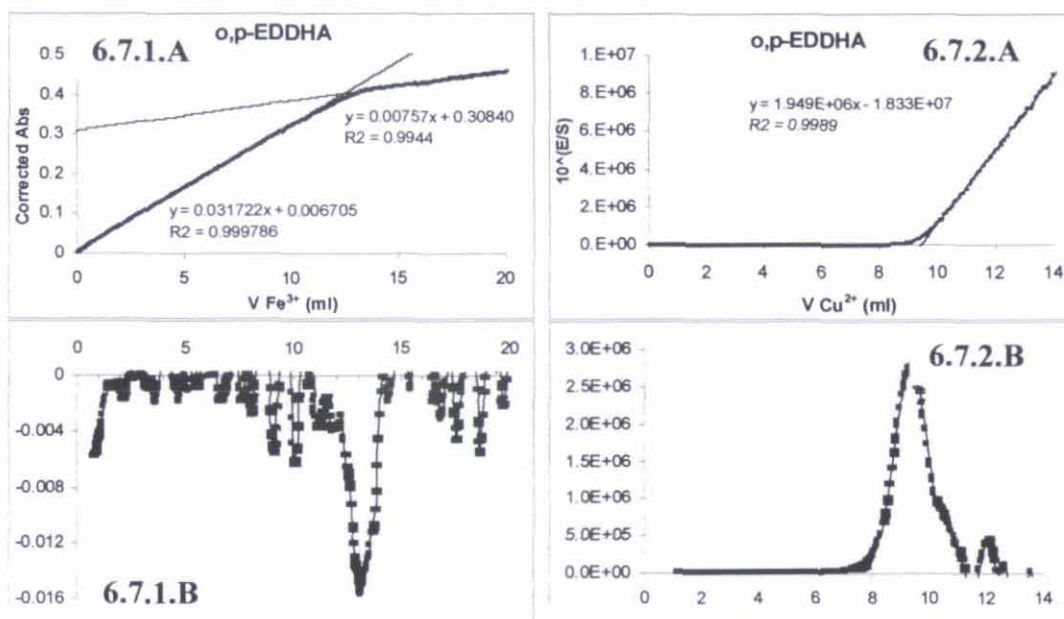
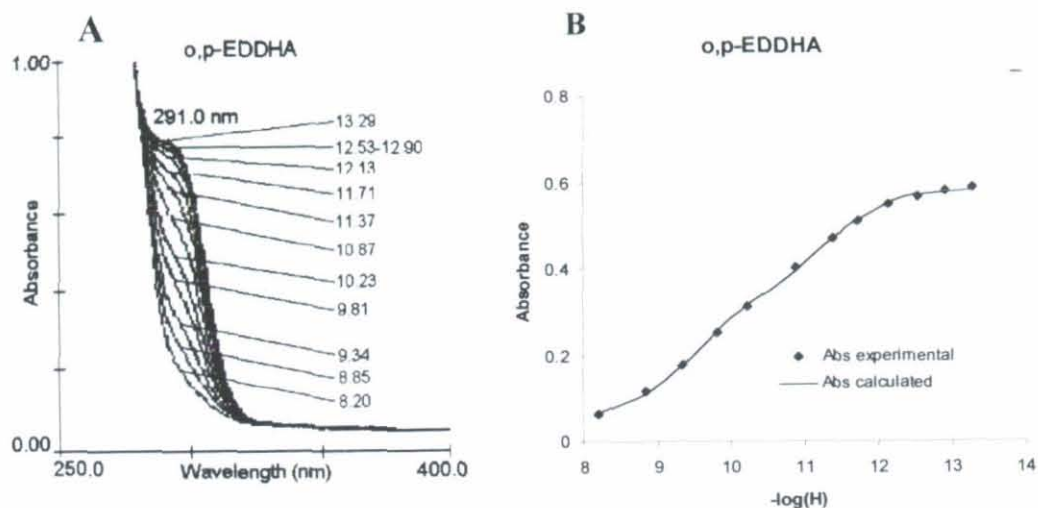


Figure 6.8. A) Ultraviolet absorption spectra of *o,p*-EDDHA ligand as a function of $p(H)$. $[o,p\text{-EDDHA}] = 9.50 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $\mu = 0.100 \text{ M}$ (NaCl + NaOH); 1 cm cell; $t = 25^\circ\text{C}$. B) The ultraviolet absorbance of *o,p*-EDDHA ligand (L) as a function of pH at wavelength maxima (nm); $[o,p\text{-EDDHA}] = 9.5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $\mu = 0.100 \text{ M}$ (NaCl + NaOH); 1 cm cell; $t = 25^\circ\text{C}$.



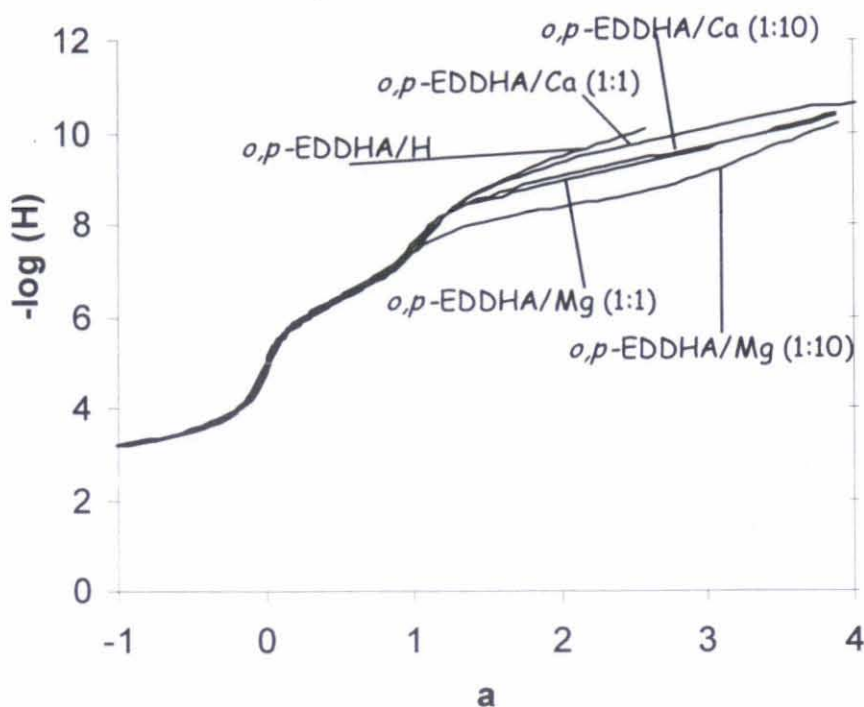
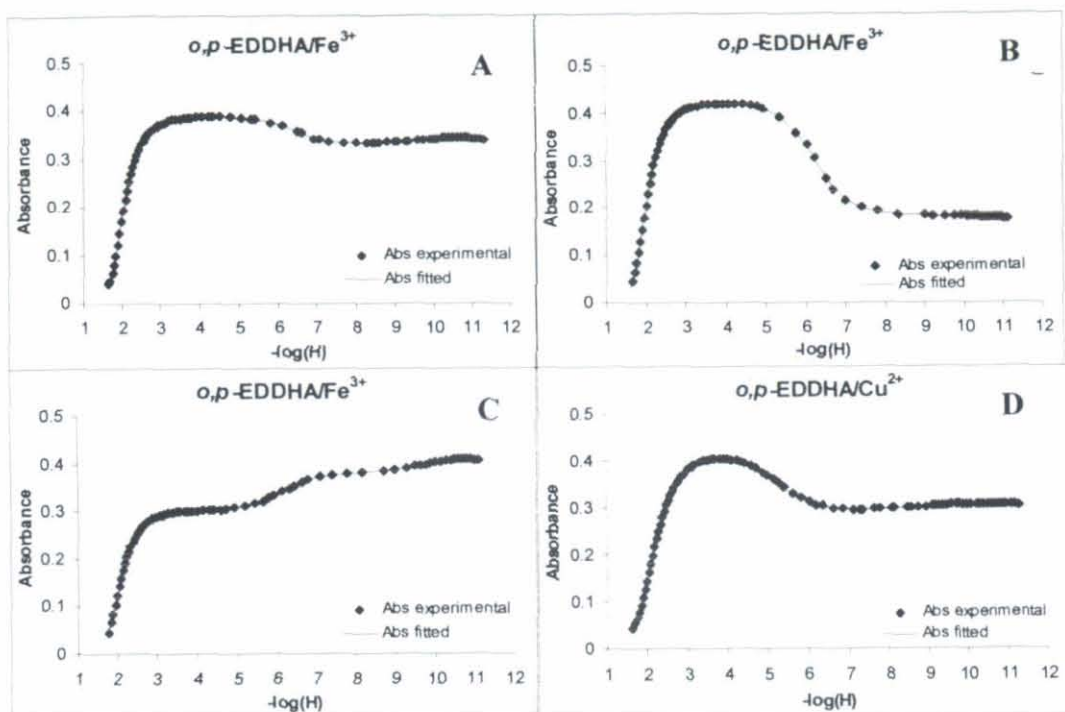


Figure 6.9. Potentiometric equilibrium curves for *o,p*-EDDHA systems. Initial concentrations: *o,p*-EDDHA alone $9.50 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. *o,p*-EDDHA/ Ca^{+2} [1:1 rate], [*o,p*-EDDHA] = $9.50 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ and [Ca^{+2}] = $1.08 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. *o,p*-EDDHA/ Ca^{+2} [1:10 rate], [*o,p*-EDDHA] = $9.50 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ and [Ca^{+2}] = $1.06 \cdot 10^{-2} \text{ M}$. *o,p*-EDDHA/ Mg^{+2} [1:1 rate], [*o,p*-EDDHA] = $9.50 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ and [Mg^{+2}] = $9.73 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. *o,p*-EDDHA/ Mg^{+2} [1:10 rate], [*o,p*-EDDHA] = $9.52 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ and [Mg^{+2}] = $9.75 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. $t = 25^\circ \text{C}$; $\mu = 0.100 \text{ M}$ (NaCl); *a* is the moles of standard NaOH solution added per mole of ligand present.

Figure 6.10. Photometric titration of *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} chelate at 480 nm (A), 530 nm (B) and 450 nm (C). Initial concentration; $[\text{o,p-EDDHA}] = 9.39 \cdot 10^{-5} \text{M}$; $[\text{Fe}^{3+}] = 9.97 \cdot 10^{-5} \text{M}$. Photometric titration of *o,p*-EDDHA/ Cu^{2+} chelate at 650 nm (D). Initial concentration; $[\text{o,p-EDDHA}] = 9.40 \cdot 10^{-4} \text{M}$; $[\text{Cu}^{2+}] = 9.36 \cdot 10^{-4} \text{M}$. $t = 25^\circ \text{C}$; $\mu = 0.100 \text{ M}$ (NaCl) and N_2 atmosphere during the titration.



CAPÍTULO 7

MODELIZACIÓN DE LOS QUELATOS FÉRRICOS EN CONDICIONES AGRONÓMICAS

7. Modelización de los quelatos férricos en condiciones agronómicas	pág
7.1. Modelos teóricos	163
7.2. Resultados y Discusión	164
7.2.1. Estabilidad del Quelato férrico en los distintos modelos	165
7.2.2. Efecto de los diferentes sustituyentes en el anillo de benceno sobre la estabilidad del quelato férrico	170
7.2.3. Efecto en los agentes quelantes con los grupos aminos unidos por cadenas hidrocarbonadas de diferente longitud y estructura.	174
7.2.4. Efecto de la isomería sobre la estabilidad de los quelatos férricos	176
7.2.5. Efecto de la sustitución total o parcial del fenol en posición <i>orto</i> respecto a la cadena de carácter aminopolicarboxílico	178

7.1. Modelos teóricos

Para conocer la estabilidad de los quelatos férricos en función de las condiciones dónde vaya a ser aplicado se han utilizado tres modelos teóricos utilizando el programa de especiación química MINTEQA2 (Allison et al. 1990). Este programa, desarrollado por la EPA, presenta dos ejecutables principales, PRODEFA2 mediante el cual se define el problema con el que trabaja y MINRUN que realiza los cálculos. PRODEFA2 produce un archivo de "entrada" que incluye todos los datos necesarios para la definición del problema y que utiliza MINRUN. Este último programa genera un archivo de "salida" con los datos del sistema especiado. MINTEQA2 tiene varias bases de datos incorporadas entre las que se incluyen la "thermo.dbs", la "type.dbs" y la "redox.dbs" en las que se encuentran los datos termodinámicos de todas las reacciones posibles en las que se ven involucrados los componentes definidos en otra base de datos, la "comp.dbs". Dichas bases de datos fueron inicialmente reemplazadas por aquellas proporcionadas por Lindsay que incluyen los datos termodinámicos correspondientes a los equilibrios químicos en suelos (Lindsay, 1979). Posteriormente se han modificado las bases de datos del programa con el objeto de introducir como nuevos componentes los nuevos agentes quelantes y como datos termodinámicos nuevos las constantes de las reacciones en las que participan las especies formadas por los componentes anteriores y considerados como aquellos para las cuales se han determinado previamente las constantes de protonación y estabilidad. En el apéndice 2 se recogen las bases de datos "comp.dbs" y "thermo.dbs" con los nuevos componentes y especies respectivamente así como un ejemplo de los archivos de "entrada" y "salida" generados para cada modelo.

Los modelos empleados se han descrito en el apartado correspondiente de modelización, en el capítulo 6 correspondiente con la especiación teórica del *o,p*-EDDHA. En la figura 7.1. se enumeran los modelos ya descritos así como su campo de aplicación. Con los tres modelos se intenta estudiar la estabilidad de los quelatos férricos frente al pH (requisito legal que deben cumplir los quelatos férricos) y la estabilidad en presencia de iones en disolución y en presencia de sus fases sólidas que controlan la solubilidad en suelo.

Figura 7.1. Modelos teóricos empleados para la modelización de los agentes quelantes.

Modelo 1: Estabilidad del quelato férrico en disolución acuosa

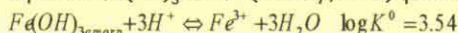
Disolución nutritiva de Hoagland (Halvorson y Lindsay, 1972). No se permite la precipitación de sólidos

Objeto: Comparar la estabilidad del quelato férrico en disolución frente al pHs en presencia de $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ en concentraciones altas.

Modelo 2: Estabilidad del quelato férrico en cultivos hidropónicos

Disolución nutritiva de Hoagland (Halvorson y Lindsay, 1972)

Equilibrio $\text{Fe}(\text{OH})_3$ amorfo (Lindsay, 1979) que controla la solubilidad del Fe^{3+} :



Objeto: Comparar la concentración del quelato férrico que permanece en la disolución nutritiva a distintos pHs

Modelo 3: Estabilidad del quelato férrico en suelos

Estabilidad en suelos calizos y competencia con otros metales (Lindsay, 1979)

Componente	Equilibrio	Log K^0
	0.0003 atm CO_2	
* Soil - Ca	$\text{Soil} - \text{Ca} \rightleftharpoons \text{Ca}^{2+}$	-2.50
* Soil - Mg	$\text{Soil} - \text{Mg} \rightleftharpoons \text{Mg}^{2+}$	-3.00
Soil - Cu	$\text{Soil} - \text{Cu} + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Cu}^{2+}$	2.80
Soil - Fe	$\text{Soil} - \text{Fe} + 3\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Fe}^{3+} + 3\text{H}_2\text{O}$	2.70
Soil - Zn	$\text{Soil} - \text{Zn} + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Zn}^{2+}$	5.80
*These equilibriums were replaced at 7.5-13 pH range by the following:		
Calcite	$\text{CaCO}_3 \rightleftharpoons \text{Ca}^{2+} + \text{CO}_3^{2-}$	-8.41
Dolomite	$\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2 \rightleftharpoons \text{Mg}^{2+} + \text{Ca}^{2+} + 2\text{CO}_3^{2-}$	-3.00

Objeto: Comparar la concentración del quelato férrico que permanece en la disolución del suelo a distintos pHs

7.2. Resultados y Discusión

En este apartado se presenta los resultados de la modelización en forma de gráficas, donde se describen con detalle la estabilidad de los distintos quelatos férricos. Se representa el porcentaje de Fe quelado total frente al pH. En general el pH de la disolución nutritiva y del suelo afecta a la especiación del quelato. Así a pH ácidos hay que considerar la formación de las formas protonadas de los quelatos (FeH_nL) y a pH básicos hay que tener en cuenta la formación de las especies de hidrólisis del quelato metálico ($\text{Fe}(\text{OH})_n\text{L}$). En el apéndice 3 se recogen todas las gráficas donde se representan la distribución de las especies en función del pH. En este capítulo sólo se recogen las correspondientes al Fe-quelado, entendiéndose que este porcentaje es la suma de todas las especies que mantienen el Fe quelado (incluyendo especies protonadas y especies hidroxiladas).

7.2.1. Estabilidad del quelato férrico en los distintos modelos.

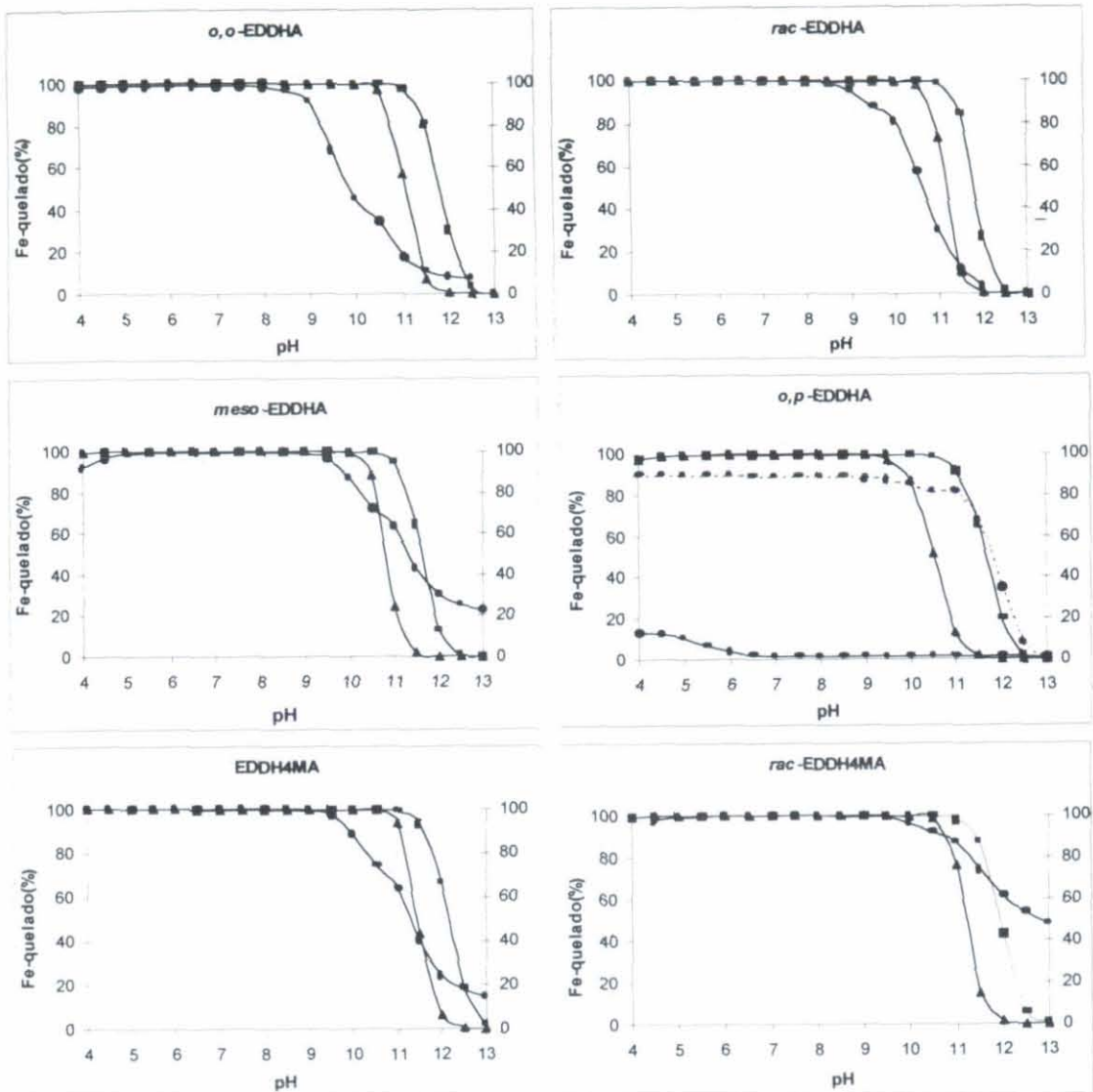


Figura 7.2. Porcentaje de Fe quelado vs. pH para cada agente quelante y en los tres medios teóricos. —■— Disolución —▲— Disolución nutritiva —●— suelo

En el caso del *o,p*-EDDHA hay dos líneas correspondientes al suelo según el nivel de Cu²⁺ en suelos sea alto (línea punteada) o bajo (línea continua) como ya se mostró en el capítulo 6.

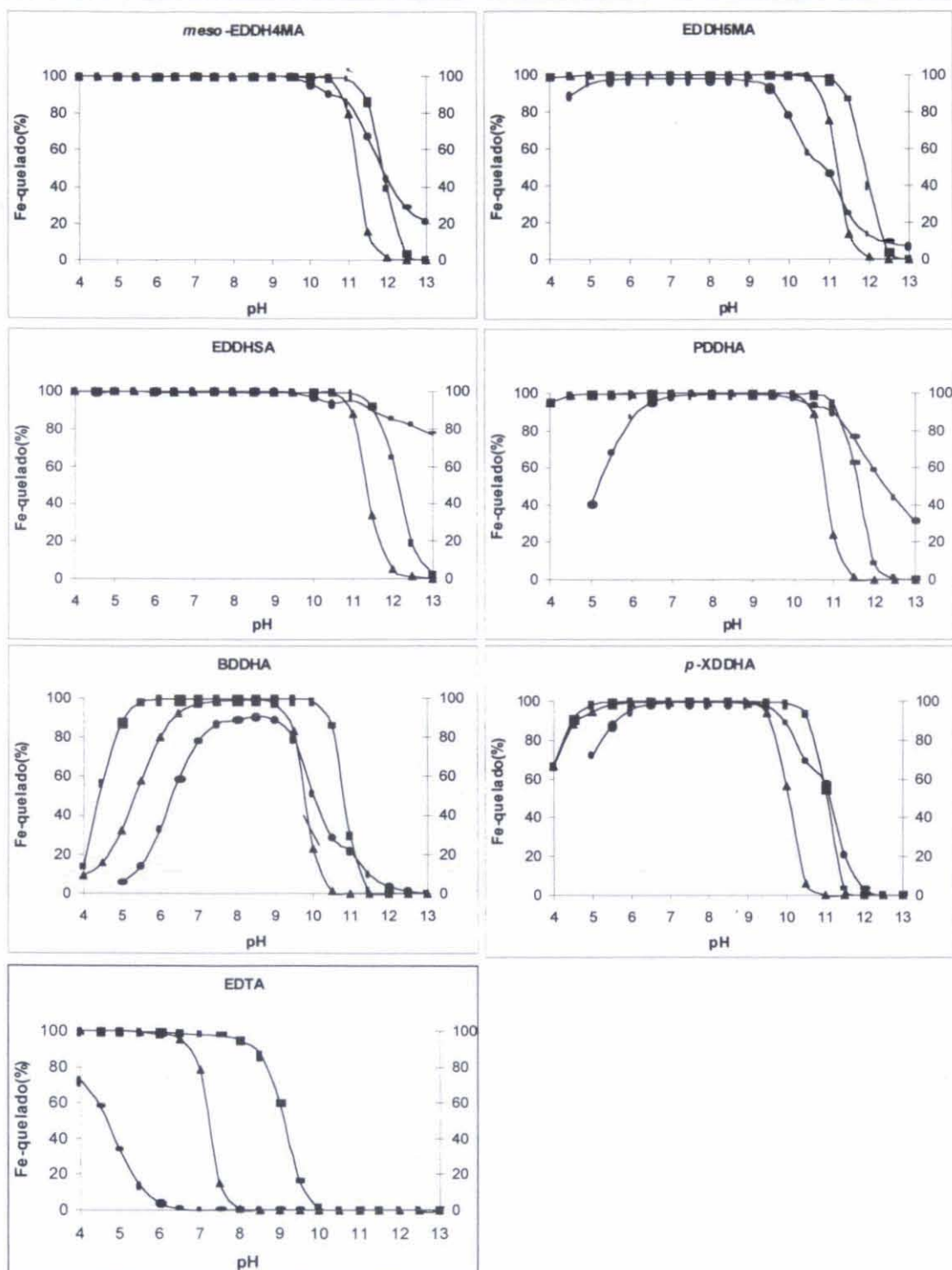


Figura 7.2. Continuación

En la figura 7.2 se representan la estabilidad de cada quelato férrico frente al pH para cada uno de los modelos teóricos anteriormente descritos. Los agentes quelantes *p,p*-EDDHA y EDDMtxA no se representan ya que no son capaces de complejar Fe^{3+} . Cuando se añade Fe^{3+} a estos productos todo él precipita y no se encuentra en disolución. Si se comparan los tres modelos para cada agente quelante, en todos los casos la línea que presenta una mayor estabilidad es la correspondiente al modelo 1 (disolución). Esto era de esperar ya que en este modelo el quelato férrico no presenta equilibrio alguno que controle la solubilidad del quelato férrico. En todos los casos el porcentaje de Fe quelado se mantiene por encima del 80% a pHs superiores a 10, excepto el EDTA/ Fe^{3+} el cual a pH superiores a 9 permanece quelado menos del 60% de todo el Fe. Los agentes quelantes BDDHA y *p*-XDDHA muestran una cierta inestabilidad a pH ácidos, de tal forma que el Fe está totalmente quelado únicamente a pHs superiores a 5.

El objetivo de utilizar el modelo de disolución es conocer la capacidad de quelación de los diferentes agentes quelantes en un medio acuoso. En los capítulos correspondientes (capítulos 3, 4, 5 y 6) se realiza una descripción detallada de las especies que se forman para cada agente quelante en función del pH. Martell y Motekaitis (1992) desarrollan un programa de especiación (SPE) el cual representa la distribución de las diferentes especies a partir de unas constantes de estabilidad dadas. Este programa se aplica ampliamente para caracterizar agentes quelantes de nueva síntesis. Bannochie y Martell en 1989 y 1990 realizaron la distribución de las diferentes especies de los isómeros del EDDHA (racémico y meso) y de los isómeros de TMPHPG (racémico y meso) respectivamente. De igual forma otros autores han realizado la distribución de las especies de agentes quelantes análogos al EDDHA, así Taliaferro y Martell (1984), Clark y Martell (1987), Motekaitis et al. (1991), Motekaitis et al. (1989), Ma y Martell (1993) y Ma et al. (1994a, 1994b, 1994c) aplican este programa informático para representar la distribución de las especies del HBED y análogos con metales tales como Fe^{3+} , Ga^{3+} , In^{3+} , etc. Para la distribución de especies este programa sólo tiene en cuenta las constantes de protonación y las de estabilidad del metal que se utiliza. Este planteamiento no es válido para un sistema más complejo donde además existen otros metales en el medio que pueden interferir o competir para la formación de quelatos.

La actual legislación sobre fertilizantes requiere describir en el etiquetado de productos del tipo quelato férrico el intervalo de pH en el cual dicho quelato es estable. A este respecto Álvarez-Fernandez, (2000) comprobó la estabilidad de disoluciones de quelatos férricos frente al pH y frente a Ca^{2+} reproduciendo un medio acuoso con contenido en calcio similar a los del suelo o disolución nutritiva. En nuestro modelo se ha comprobado la estabilidad de los quelatos férricos en un medio acuoso en presencia de Ca y Mg y de otros metales (Cu^{2+} , Fe^{3+} , H^+) en unas concentraciones semejantes a las "típicas", entendiéndose por "típicas" aquellas concentraciones que son normalmente utilizadas en disolución nutritiva para el crecimiento óptimo de la planta y propuestas por Hoglands (Halvorson y Lindsay, 1972)). Además con el programa utilizado (MINTEQA2, Allison et al. 1990) se tienen en cuenta todas las constantes de estabilidad de las reacciones en las que están involucrados dichos metales con los agentes quelantes.

Para el caso del modelo 2 (cultivos hidropónicos con posibilidad de precipitación del Fe), el comportamiento de los productos es similar al de la estabilidad en disolución. La presencia del equilibrio con hidróxido férrico como sólido que controla la solubilidad del Fe^{3+} hace que la estabilidad del Fe-quelado sea menor que en el modelo 1. Las diferencias entre las estabilidades de los quelatos en ambos modelos es función directa de la constante de estabilidad del quelato/ Fe^{3+} . Así los agentes quelantes EDDHA y sus isómeros, EDDH4MA y sus isómeros, EDDH5MA y EDDHSA presentan el 100% del Fe total en forma quelada a pHs de 10. Para el caso del *o,p*-EDDHA, el descenso de Fe-quelado es más acentuado aunque siga manteniendo más del 80% del Fe total en disolución a pH de 10. Los agentes quelantes PDDHA y *p*-XDDHA no experimentan una disminución significativa del Fe-quelado a pHs ácidos, mientras que a pHs básicos mantienen el 100% del Fe-quelado hasta pHs de 10 y 9 respectivamente. El agente quelante BDDHA es el que sufre una mayor pérdida de Fe-quelado cuando se pone en equilibrio con el hidróxido férrico, de tal forma que sólo mantiene todo el Fe en forma de quelato en el intervalo de pH de 7 a 9. Para el caso del EDTA, en medios hidropónicos sólo mantiene el 80% del Fe total en disolución a pHs de 7.5.

En este segundo modelo teórico se pretende simular el comportamiento de los diferentes agentes quelantes en disoluciones nutritivas usadas para cultivos hidropónicos. En ambos casos la nutrición férrica de las plantas es muy dependiente de su presencia en la disolución, por lo tanto se hace necesario realizar un aporte regular de Fe en forma

soluble. Los fertilizantes férricos más empleados en estos casos son los quelatos férricos (Cadahía, 2000). Como se ha mencionado antes, Halvorson y Lindsay (1972) desarrollaron un programa de modelización para calcular la especiación de los metales quelados en disoluciones nutritivas. A diferencia con el primer modelo propuesto, en disoluciones nutritivas se pueden establecer los equilibrios con los óxidos e hidróxidos y en particular con el hidróxido férrico amorfo. Por lo tanto, es necesario incluir el equilibrio con el hidróxido férrico como controlador de la solubilidad de tal forma que cuando el Fe^{3+} no se encuentre quelado se retire de la disolución por precipitación. En este modelo es muy importante observar el porcentaje de Fe quelado a lo largo de todo el pH ya que, a diferencia de los otros modelos, la variación de pH en fertirrigación puede ser muy grande y los procesos de descomposición-recomposición adquieren gran importancia en este modelo (Bermúdez, 1998)

En el modelo 3 (estabilidad en suelos), el comportamiento de los agentes quelantes sigue la tendencia marcada en los otros dos modelos. Aquellos agentes quelantes que eran estables en condiciones hidropónicas lo siguen siendo en este modelo a pHs entre 5.5 - 8.5 (excepto el *o,p*-EDDHA cuya estabilidad dependerá mucho de la concentración de cobre que haya en el suelo). Así, los agentes quelantes EDDHA y sus isómeros, EDDH4MA y sus isómeros, EDDHSA y EDDH5MA presentan todo el Fe en forma de quelato a pHs superiores a 9. El EDDH5MA a pHs ácidos (inferiores a 5) presenta una cierta desestabilización del Fe-quelado. El EDDHSA presenta una mayor estabilidad en suelo que en disolución nutritiva. El agente PDDHA presenta una estabilidad elevada en suelos, manteniendo el 100% del Fe total en forma soluble a pHs superiores de 10 pero a pHs ácidos es capaz de complejar todo el Fe a pHs superiores a 7. Este mismo efecto ocurre en el caso del *p*-XDDHA el cual es muy estable a pH básico pero no así a pHs ácidos. El BDDHA presenta una estabilidad en suelos baja como quelato férrico ya que no es capaz de mantener todo el Fe en forma de quelato y sólo es estable en un intervalo de pH muy estrecho (7,5-9). En el caso del EDTA/ Fe^{3+} su descomposición es inmediata ya que a pH 6 prácticamente todo el Fe que se ha puesto ha precipitado.

En los modelos anteriores se ha utilizado la composición de una disolución nutritiva de Hoagland (Halvorson y Lindsay, 1972) para conocer la estabilidad de los quelatos férricos en disolución y en condiciones hidropónicas. El objetivo del tercer modelo es estudiar la estabilidad de un quelato férrico en un suelo teórico. Para ello lo que se hace

es poner en equilibrio el quelato férrico con las distintas fases sólidas para controlar la solubilidad de los metales que pueden competir con dicho quelato. De igual forma se intenta predecir la estabilidad frente al pH de estos quelatos férricos en un suelo. Debido a que la aplicación de estos quelatos se produce principalmente en suelos calizos, es necesario introducir los equilibrios de las fases sólidas del Ca y del Mg como mayores competidores en este tipo de suelos. Dependiendo de la zona de pH dónde nos encontremos habrá un equilibrio predominante. En la figura 7.1 se recogen los equilibrios que se incluyen en este modelo, se puede observar que los equilibrios Ca-suelo y Mg-suelo son los que controlan la solubilidad hasta pH 7.5, luego, y hasta pH 13 son los equilibrios con calcita y dolomita dependientes de la presión parcial de CO_2 los predominantes. Además del Ca y del Mg, la presencia de micronutrientes tales como Cu, Mn y Zn en suelos pueden afectar sobre la estabilidad del quelato férrico. Varios autores han dicho que el Cu^{2+} puede ser el mayor competidor para este tipo de quelatos férricos (Tong et al. 1986; Norvell, 1991; Lucena et al., 1987b; Álvarez-Fernández et al., 1997 y Pérez-Sanz, 1993). Por este motivo se introduce el equilibrio del Cu-suelo en el modelo descrito.

En el caso del *o,p*-EDDHA la estabilidad en los tres modelos se ha comentado profusamente en el capítulo 6. A modo de resumen se puede decir que su estabilidad en disolución y en condiciones hidropónicas es comparable a la de su isómero posicional el *o,o*-EDDHA. La diferencia reside en su comportamiento en suelos donde cuando se pone en equilibrio con el Cu del suelo (definido por Lindsay), el porcentaje de Fe que permanece en disolución es muy bajo, en cambio cuando la concentración de Cu que hay en el suelo es de 10^{-5}M (nivel bajo de Cu en suelos) la mayoría del Fe total permanece como Fe quelado hasta pHs muy básicos.

7.2.2. Efecto de los diferentes sustituyentes en el anillo de benceno sobre la estabilidad del quelato férrico

En la figura 7.3 se compara el porcentaje de Fe quelado por cada agente quelante en función del pH y del modelo utilizado para los agentes quelantes que poseen diferentes sustituciones en el anillo de benceno (5- SO_3H (EDDHSA); 4- CH_3 (EDDH4MA); 5- CH_3 (EDDH5MA)) y el EDDHA. Además se comparan con el EDTA.

La estabilidad de todos estos quelatos en disolución (sin precipitación) es similar y

muy superior a la estabilidad del EDTA/Fe^{3+} . Todos ellos mantendrían el 100% del Fe total en forma quelada hasta pH 11. El EDDH4MA y el EDDHSA presentan una mayor estabilidad. El EDTA mantiene el 100% del Fe total como quelado sólo hasta un pH de 7.5.

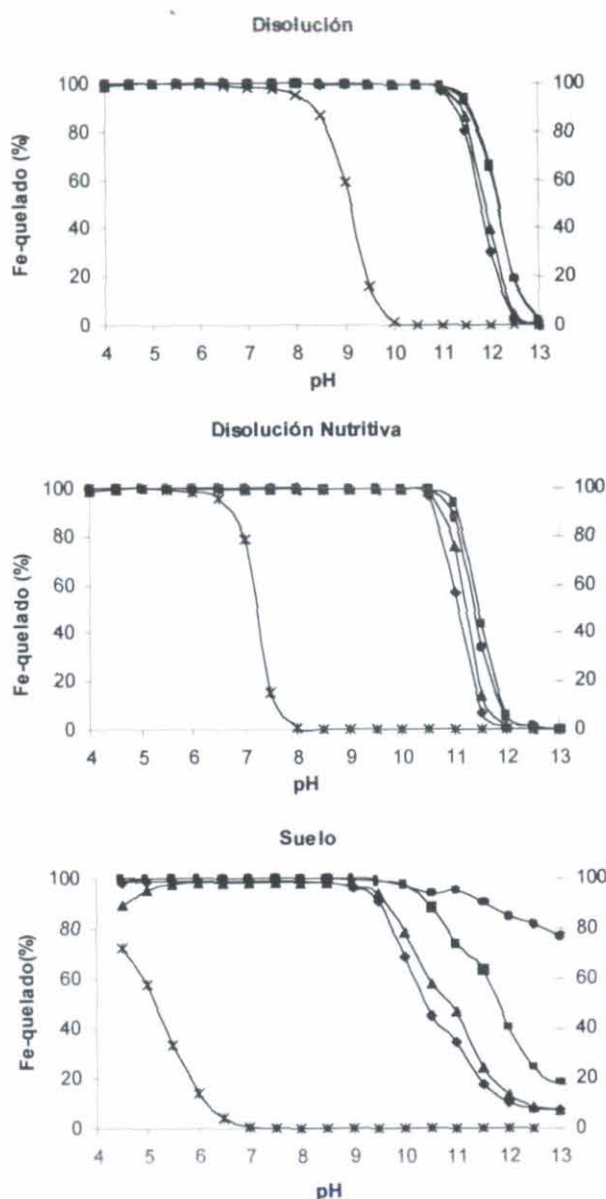


Figura 7.3. Porcentaje de Fe quelado vs pH. Efecto de los diferentes sustituyentes en el anillo de benceno.

—●— EDDHSA —▲— EDDH5MA
—■— EDDH4MA —◆— EDDHA —*— EDTA

Cuando se compara la estabilidad en condiciones hidropónicas, se "permite" establecer el equilibrio con Fe(OH)_3 amorfo, igualmente todos los agentes quelantes, excepto el EDTA, mantienen el 100% del Fe en forma quelada hasta un pH de 10,5. La presencia del equilibrio del hidróxido férrico hace que las diferencias entre los agentes quelantes aumente. Si se compara el porcentaje de Fe quelado a pH 11 para cada agente quelante, el EDDH4MA y el EDDHSA mantienen más del 90% del Fe en forma quelada. Al mismo pH, el EDDH5MA y el EDDHA mantienen el 75% y el 55% respectivamente. Todos ellos son más estables que el EDTA, el cual a pH 7.5 sólo mantiene quelado aproximadamente el 15% del Fe total. Es importante reseñar que

en presencia de hidróxido férrico amorfo la especie que se descompone a pHs altos es la especie hidroxilada (FeOHL). Por lo tanto la diferencia de estabilidad entre el quelato en

disolución y el quelato en condiciones de hidroponía dependerá de la influencia de esta especie sobre el porcentaje total de Fe-quelado y de la estabilidad frente a la competencia con otros metales (p. ej, Mg^{2+} , Ca^{2+} y Cu^{2+}).

En condiciones de suelo, estas diferencias se hacen más grandes, aunque todos los agentes quelantes con sustituyentes en el anillo de benceno mantienen soluble el 100% del Fe total hasta pH 9, excepto el EDTA. La secuencia de la estabilidad de los agentes quelantes es EDDHSA > EDDH4MA > EDDH5MA > EDDHA >>> EDTA. El agente quelante más estable es el EDDHSA en todo el rango de pH estudiado, así a pH 13 todavía mantiene el 80% del Fe total como quelado. A pH 11 el porcentaje de Fe quelado para EDDHSA, EDDH4MA, EDDH5MA y EDDHA es del 95, 75, 45 y 35% respectivamente. El EDDH5MA presenta cierta inestabilidad para mantener todo el Fe quelado a pHs ácidos ($pH < 6$). A $pH > 6$ el $EDTA/Fe^{3+}$ se descompone produciendo la precipitación del Fe en forma de hidróxido e inmovilizando el Fe en el suelo.

Por todo lo visto hasta ahora podemos decir que la adición de grupos $-SO_3H$ y $-CH_3$ dentro del anillo de benceno, lejos de producir un descenso de la estabilidad por mantener el Fe quelado produce un ligero aumento de la estabilidad del quelato férrico en condiciones de disolución y de cultivos hidropónicos. Además en el caso de la aplicación de éstos en suelo producen un aumento de la estabilidad, siendo el EDDHSA el que mantiene un mayor porcentaje de Fe quelado. En todo caso todos ellos pueden ser aplicados en suelos calizos, excepto el EDTA tal y como ya había demostrado Lindsay (1979). Se puede decir que la presencia de los grupos metilos y los grupos sulfonilos en el anillo de benceno producen un ligero aumento de la selectividad por Fe^{3+} ya que desciende la selectividad por Cu^{2+} .

Como se ha comentado en los apartados anteriores, la legislación española y comunitaria sobre quelatos férricos obliga a especificar el intervalo de pH en el que se garantiza la estabilidad de la fracción de Fe en forma de quelato. Por lo tanto se puede decir que la sustitución de grupos funcionales en el anillo de benceno no afecta sobre la estabilidad de los quelatos férricos frente al pH en condiciones de disolución, cultivos hidropónicos y suelo. Todos ellos garantizan que todo el Fe se encuentra en forma de quelato en pHs agronómicos (5-9). La estabilidad de los quelatos en disolución y en hidroponía es muy dependiente de sus constantes de estabilidad, como no existen

diferencias significativas en las constantes de estabilidad entre los quelatos férricos EDDHA/ Fe^{3+} , EDDH4MA/ Fe^{3+} , EDDH5MA/ Fe^{3+} y EDDHSA/ Fe^{3+} es de esperar que su estabilidades sean comparables. Hjelte y Aminken (1989) demuestran que el EDDHA/ Fe^{3+} , EDDHMA/ Fe^{3+} son estables en el intervalo 4-9, siendo el primero más estable en el intervalo de pH de 4 a 6 mientras que en el intervalo de pH de 8-9 es el segundo el más estable. Estos datos están de acuerdo con los aquí presentados (fig. 7.3) ya que se observa que a pHs muy básicos el EDDH4MA presenta una mayor estabilidad que el EDDHA para todos los modelos. Con respecto al suelo, además de las constantes de estabilidad del quelato férrico también son importantes las constantes de estabilidad del agente quelante con otros cationes que estén presentes de forma significativa. La disminución de la estabilidad del quelato EDDHA/ Fe^{3+} puede ser debida a la mayor competencia que existe entre el Fe^{3+} y el Cu^{2+} por complejarse con el agente quelante. De esta forma se podría decir que el EDDHA es un más eficaz complejante de Cu^{2+} que el resto de los agentes quelantes, sobre todo respecto del EDDHSA.

Al comparar la diferente posición del grupo metilo dentro del anillo benceno (EDDH4MA y EDDH5MA), la tendencia observada para sus constantes de estabilidad con Fe^{3+} se mantiene en la modelización. Aunque ambos quelatos férricos mantienen el Fe quelado en los pHs agronómicos, el EDDH4MA/ Fe^{3+} presenta una mayor estabilidad que el EDDH5MA/ Fe^{3+} , además en condiciones de suelo el EDDH5MA/ Fe^{3+} presenta una disminución de la estabilidad por mantener el Fe quelado a pHs inferiores a 5, este hecho puede ser importante porque, dependiendo de su ritmo de descomposición/recomposición y de su reactividad con los diferentes componentes del suelo así será su estabilidad.

Álvarez-Fernández (2000) concluyó que la "reactividad" de los quelatos férricos de EDDHA, EDDHMA, EDDHSA y EDDCHA son similares ante factores como el pH, el tiempo y la interacción con diferentes componentes del suelo y suelos calizos. Además observó que la diferencia de estabilidad del Fe de las formulaciones comerciales dependía de la cantidad y estabilidad de otras sustancias de naturaleza desconocida que están presentes. De aquí la importancia de utilizar compuestos muy puros realizar este tipo de ensayos.

La estabilidad del EDTA/ Fe^{3+} está muy estudiada y los resultados obtenidos en este capítulo están de acuerdo con los obtenidos por otros autores (Lindsay, 1979) quien ya indicaba la limitación de este quelato férrico en suelos calizos.

7.2.3. Efecto en los agentes quelantes con los grupos aminos unidos por cadenas hidrocarbonadas de diferente longitud y estructura.

En la figura 7.4. se representa el porcentaje de Fe quelado en función del pH para cada uno de los tres modelos para los agentes quelantes análogos al EDDHA pero con los grupos aminos unidos por cadenas hidrocarbonadas de diferente longitud (etilen, EDDHA; propilen, PDDHA y butilen BDDHA) y estructura (*para*-xililen, *p*-XDDHA). Además, igual que en los casos anteriores se compararán con la estabilidad del EDTA en cada modelo.

En disolución y a pHs básicos, todos los agentes en estudio, exceptuando el EDTA, presentan una gran eficacia para mantener todo el Fe en forma quelada. A pH = 10 el 100% del Fe se mantiene como Fe quelado. Aún así el EDDHA se presenta como el agente quelante más estable en todo el intervalo de pH. Por el contrario, el BDDHA presenta la menor estabilidad, sobre todo a pHs ácidos ya que a $\text{pH} < 6$ el quelato férrico no está totalmente formado. Esta inestabilidad a pHs ácidos también ocurre, aunque en menor medida, para el PDDHA y el *p*-XDDHA.

En el modelo de estabilidad frente a condiciones hidropónicas (modelo 2) la tendencia observada para el primer modelo se mantiene e incluso se incrementa. A pHs básicos se siguen manteniendo la totalidad del Fe en forma quelada, hasta pH de 9.5. El EDDHA sigue siendo el quelato más estable en todo el intervalo de pH, así, y como ejemplo, a pH = 10.5 el porcentaje de Fe quelado para EDDHA, PDDHA, *p*-XDDHA y BDDHA es del 96, 89, 6 y 1% respectivamente. A pHs ácidos se acentúa la tendencia observada para el primer modelo. Así el BDDHA sólo es capaz de mantener todo el Fe en forma quelada en un intervalo de pH de 7,5 a 9,5. En el caso del *p*-XDDHA es a pH 6 cuando todo el Fe se encuentra quelado. Este fenómeno tiene una gran importancia para el caso de la aplicación de los quelatos férricos en cultivos hidropónicos, ya que las variaciones bruscas del pH a las que están sometidas las disoluciones (Lucena et al. 1991) pueden afectar en mayor medida a los quelatos férricos que tienden a descomponerse a pHs ligeramente ácidos (Bermúdez et al. 1998 y Bermúdez et al. 1999). Por lo tanto si se

aplicasen estos quelatos en disoluciones hidropónicas concentradas sería recomendable, sobre todo para el BDDHA y en menor medida para el *p*-XDDHA, no trabajar a pHs inferiores a 7.

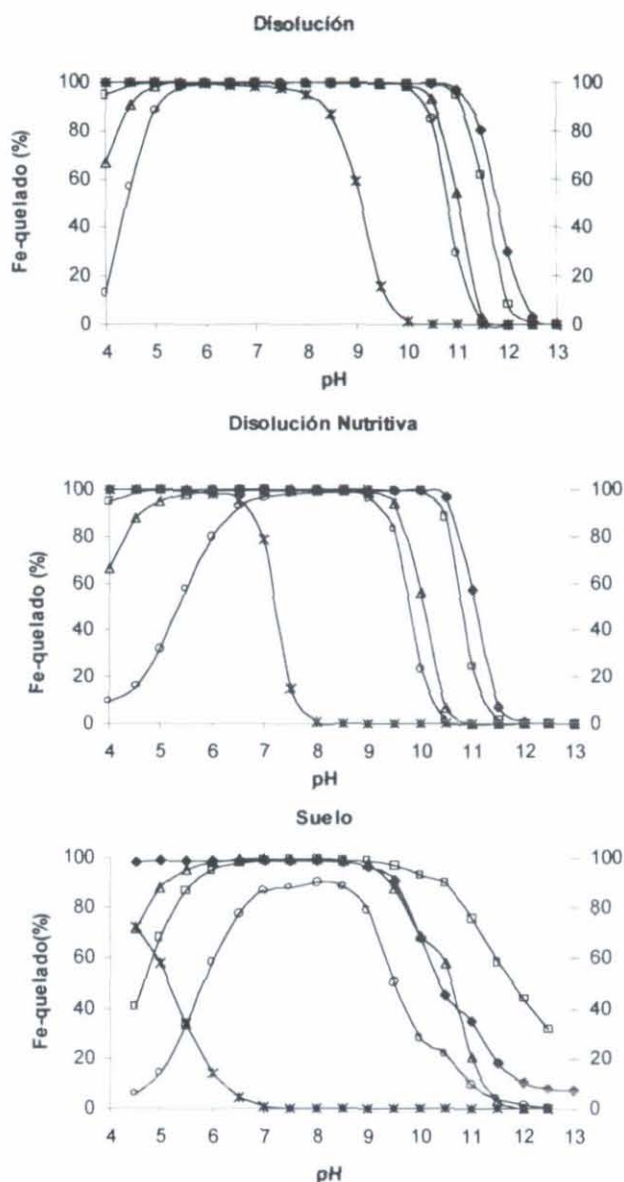


Figura 7.4. Porcentaje de Fe-quelado vs. pH. Efecto de los grupos amino unidos por cadenas hidrocarbonadas de diferente longitud y estructura.

—◆— EDDHA —○— BDDHA
—△— *p*-XDDHA —□— PDDHA —*— EDTA

quelato férrico.

En el caso de la aplicación de estos quelatos en suelos, sorprendentemente el *p*-XDDHA es el que presenta una mayor estabilidad para mantener el Fe quelado a pHs básicos. Esto es debido, como ya se ha comentado en los capítulo 5, a que el agente quelante tiene muy poca afinidad por el Cu^{2+} , por lo tanto y unido a que poseen una mayor basicidad que el EDDHA produce este efecto. Sin embargo, al igual que ocurría en los modelos anteriores, su uso resultaría problemático a pHs ácidos ya que el quelato férrico podría descomponerse y está demostrado que su cinética de recuperación es lenta. El PDDHA posee una estabilidad similar al EDDHA en medios básicos aunque desciende a medida que el pH es más ácido. La menor capacidad para mantener el Fe quelado está en el BDDHA. Este quelato férrico sólo es capaz de mantener el 80 % de todo el Fe en forma quelada en un intervalo de pH de 7 a 8.5. En el resto del intervalo de pH se produce la descomposición del

A medida que aumenta la longitud de la cadena hidrocarbonada que une los aminos se produce un descenso de la estabilidad del quelato férrico. Debido a la mayor basicidad de estos agentes quelantes frente al EDDHA (véase las constantes de protonación) es a pHs ácidos cuando mayor es la descomposición de estos productos. La adición de un grupo *p*-xililen para unir los grupos aminos produce una mayor estabilidad en condiciones de suelo aunque a pHs ácidos se produce la descomposición del quelato férrico.

Son muy pocos los estudios realizados con este tipo de quelatos férricos para conocer su estabilidad real en condiciones agronómicas. Existen estudios con otro tipo de agentes quelantes análogos al EDDHA pero siempre en condiciones de disolución acuosa. White (1988) sintetizó agentes quelantes análogos al EDDHA variando la cadena carbonada de 2 (etilen) a 5 (pentilen), observó que la mayor estabilidad de los quelatos formados era con el EDDHA (cadena de 2 carbonos). Todos estos estudios apuntan que a medida que se aumenta la cadena carbonada, la eficacia para quelar Fe^{3+} disminuye (Bannochie y Martell, 1998; Ahrlund, 1990). Esta tendencia se ha observado con las constantes de estabilidad y, por extensión, en su modelización.

7.2.4. Efecto de la isomería sobre la estabilidad de los quelatos férricos

En la figura 7.5. se representa el porcentaje de Fe quelado frente a pH para los diferentes isómeros geométricos del EDDHA y del EDDH4MA. De forma general se puede decir que los diferentes isómeros geométricos de EDDHA y EDDH4MA presentan una gran capacidad para mantener todo el Fe en forma quelada independientemente del medio donde se apliquen (disolución, hidroponía y suelo). De forma más particular se puede decir que en los modelos de disolución y de hidroponía el quelato férrico menos estable es el *meso*-EDDHA, aunque es capaz de mantener el Fe quelado hasta pHs muy básicos. Este resultado está de acuerdo con sus constantes de estabilidad. Para el resto de isómeros no se aprecian diferencias significativas.

Cuando se aplican estos quelatos férricos en el modelo del suelo, aunque todos son estables hasta pHs muy básicos, la secuencia es *rac*-EDDH4MA > *meso*-EDDHA > *meso*-EDDH4MA > *rac*-EDDHA. Esta secuencia no corresponde con las constantes de estabilidad, sin embargo el *meso*-EDDHA, en mayor medida, y el *rac*-EDDH4MA, los isómeros con las constantes de estabilidad más bajas, presentan una cierta inestabilidad a pHs ácidos, esto puede producir que estos quelatos presenten una mayor reactividad

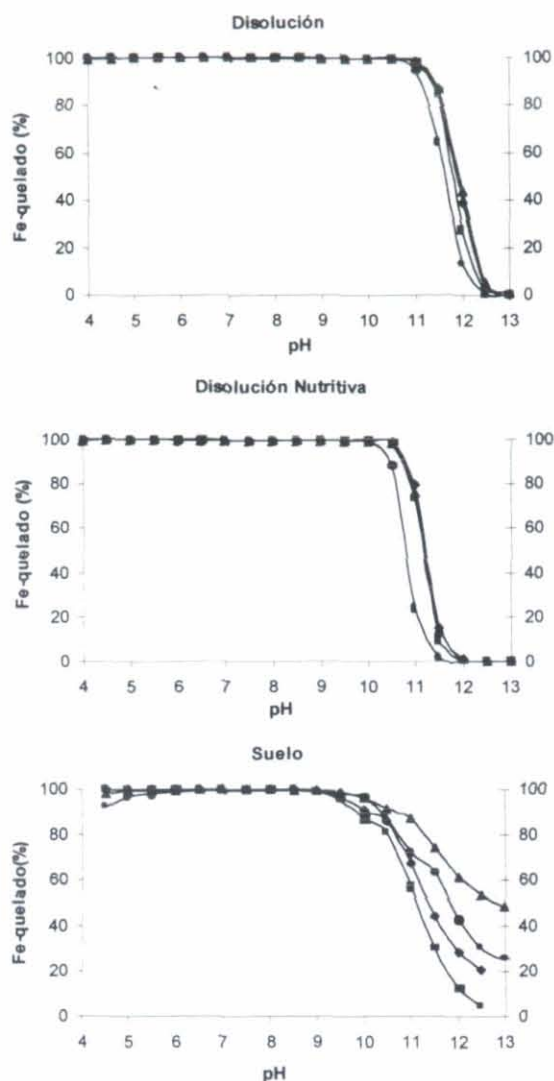


Figura 7.5. Porcentaje de Fe-quelado vs. pH. Estabilidad de los diferentes isómeros de EDDHA y EDDH4MA.

—■— rac-EDDHA —●— meso-EDDHA
—◆— meso-EDDH4MA —▲— rac-EDDH4MA

frente a diferentes componentes del suelo. La mayor estabilidad del *rac*-EDDH4MA y *meso*-EDDHA por mantener el Fe-quelado puede ser debida a que estos agentes quelantes poseen una mayor selectividad por el Fe^{3+} que por el Cu^{2+} o por otros metales. Aunque sus constantes de estabilidad son menores, la competencia entre el Fe^{3+} y los otros metales es menor para estos isómeros que para el *rac*-EDDHA y el *meso*-EDDH4MA y esto hace que sean capaces de mantener más Fe-quelado.

Como ya se ha discutido en el capítulo 4, los resultados de las constantes de estabilidad para los isómeros $\text{EDDHA}/\text{Fe}^{3+}$ y $\text{EDDH4MA}/\text{Fe}^{3+}$ que se obtienen en este trabajo están de acuerdo con las obtenidas por Bannochie y Martell (1989) y Ahrlund et al. (1990). De tal forma que los isómeros *rac*-EDDHA/ Fe^{3+} y *meso*-EDDH4MA/ Fe^{3+} presentan las mayores estabilidades. Hernández-Apaolaza (1997) realiza diferentes estudios de adsorción y reactividad con componentes del suelo. No encuentra retención significativa

sobre carbonato cálcico de ningún isómero del EDDHA y EDDHMA, en cambio los isómeros *meso*-EDDHA/ Fe^{3+} y *rac*-EDDH4MA/ Fe^{3+} están mas adsorbidos sobre montmorillonita-Ca, óxidos e hidróxidos y materia orgánica. Bermúdez et al. (1998) y Bermúdez et al. (1999) demuestran que cuando se aplican los isómeros en cultivos hidropónicos y debido a la variación brusca de pH, la descomposición y recomposición de los isómeros *meso*-EDDHA/ Fe^{3+} y *rac*-EDDH4MA/ Fe^{3+} está más afectada que la de los

otros isómeros. Por lo tanto, aunque la estabilidad de los isómeros sea similar, la reactividad y descomposición está directamente relacionada con las constantes de estabilidad del quelato férrico.

7.2.5. Efecto de la sustitución total o parcial del fenol en posición *orto* respecto a la cadena de carácter aminopolicarboxílico

Como ha quedado demostrado en el capítulo 4, la sustitución de los dos grupos hidroxilo por grupos metoxilo (EDDMtxA) o la sustitución de los dos grupos hidroxilo en posición *orto* a la posición *para* (*p,p*-EDDHA) provocan que no se forme el correspondiente quelato férrico.

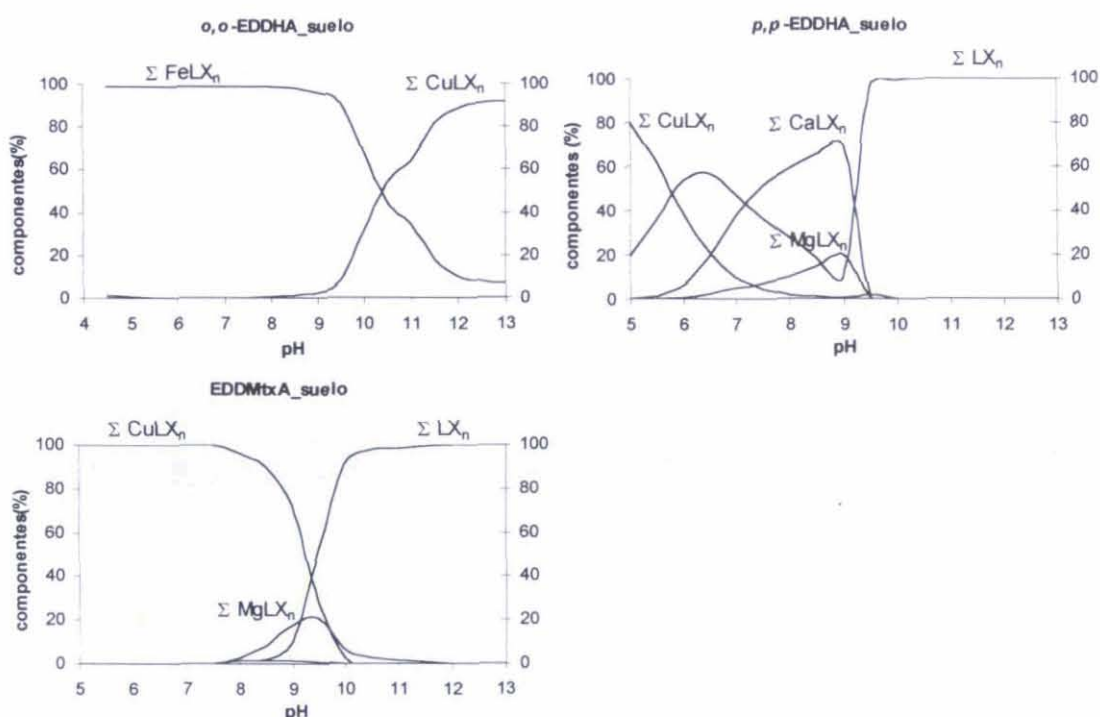


Figura 7.6. Distribución porcentual de las formas del agente quelante con los metales vs. pH. Efecto de la distribución total o parcial del grupo fenolato con el hidroxilo en *orto* respecto de la cadena de carácter aminocarboxílico sobre la estabilidad en suelo

En la figura 7.6. se muestran, a modo de ejemplo, los componentes que se formarían cuando se usa el modelo de suelo y se compara con los del *o,o*-EDDHA. Así, mientras que

en el *o,o*-EDDHA se encuentra todo el agente quelante en forma quelada por Fe^{3+} (hasta pH 10) o por Cu^{2+} (a pHs superiores a 10), en el caso del *p,p*-EDDHA y del EDDMtxA a pHs básicos el agente quelante está en forma libre por lo que da un índice de la baja afinidad de estos agentes quelantes por los metales.

En el capítulo 6 se ha estudiado profusamente el caso del *o,p*-EDDHA y la competencia con el Cu^{2+} .

Hernández-Apaolaza (1997) postuló la existencia de los isómeros posicionales *o,p*-EDDHA y *p,p*-EDDHA en las muestras comerciales de EDDHA. Atendiendo a los resultados obtenidos, la estabilidad y reactividad del EDDHA por mantener el Fe quelado dependerá, además de la estabilidad propia del quelato férrico, de la proporción existente de los otros isómeros posicionales. Así, cuanto mayor proporción haya del isómero *p,p*-EDDHA en la formulación, menor será la estabilidad de ese quelato ya que menos cantidad de Fe está quelado.

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN GENERAL

8.	<i>Discusión General</i>	pág
8.1.	RIQUEZA DE LOS AGENTES QUELANTES	185
8.2.	CONSTANTES DE FORMACIÓN	189
8.2.1.	Constantes de protonación	189
8.2.1.1.	Efecto de la presencia de grupos funcionales en el anillo bencénico	191
8.2.1.2.	Efecto de la longitud y estructura de las cadenas hidrocarbonadas centrales	192
8.2.1.3.	Efecto de la posición de los grupos fenolatos	193
8.2.1.4.	Efecto de la isomería geométrica	193
8.2.2.	Constantes de estabilidad con Ca^{2+} y Mg^{2+}	194
8.2.2.1.	Efecto de la presencia de grupos funcionales en el anillo bencénico	195

8.2.2.2. Efecto de la longitud y estructura de las cadenas hidrocarbonadas centrales	196
8.2.2.3. Efecto de la posición de los grupos fenolatos	196
8.2.2.4. Efecto de la isomería geométrica	197
8.2.3. Constantes de estabilidad con Cu^{2+} y Fe^{3+}	197
8.2.3.1. Efecto de la presencia de grupos funcionales en el anillo bencénico	200
8.2.3.2. Efecto de la longitud y estructura de las cadenas hidrocarbonadas centrales	201
8.2.3.3. Efecto de la posición de los grupos fenolatos	202
8.2.3.4. Efecto de la isomería geométrica	203
8.3. pFe^{3+} y pCu^{2+}	204
8.4. MODELIZACIÓN TEÓRICA DE LOS QUELATOS FÉRRICOS EN CONDICIONES AGRONÓMICAS	208

8. DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo del presente capítulo es presentar los resultados más relevantes y las técnicas analíticas puestas a puntos, así como comparar los resultados obtenidos con los resultados bibliográficos. Los diferentes resultados se irán discutiendo según los objetivos que se plantearon al inicio de la presente tesis.

8.1. RIQUEZA DE LOS AGENTES QUELANTES

En la figura 8.1 se muestran las riquezas obtenidas para los agentes quelantes que

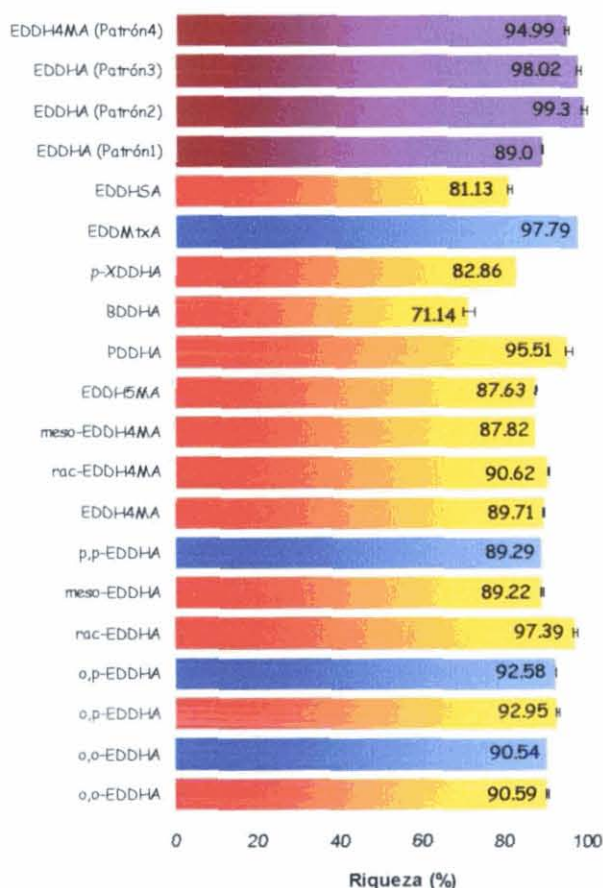


Figura 8.1. Riqueza (%) de los agentes quelantes por ■ valoraciones fotométricas con Fe^{3+} y ■ valoraciones potenciométricas con Cu^{2+} . Las barras de error representan el intervalo de confianza de tre repeticiones al 95%

obtenidas por el método propuesto son prácticamente iguales a las nominales mientras

se han utilizado en este trabajo. En tonos rojizos se muestran las riquezas obtenidas mediante valoraciones fotométricas con Fe^{3+} como agente valorante. En tonos azulados se representan las riquezas obtenidas mediante valoraciones potenciométricas con Cu^{2+} . Además, y para poner a punto el método fotométrico, se determinaron las riquezas sobre unos patrones comerciales de EDDHA (Patrón 1 y 2 procedentes de Sigma-Aldrich, lotes 26H5012 y 117F50221 y patrón 3 de Promochem GmbH D46485 lote ANCO01) y EDDH4MA (patrón 4 procedente de Promochem GmbH D46485 lote ANCO02). Las riquezas declaras de estos patrones eran 98% para los patrones 1, 2 y 3 y un 96% para el patrón 4. Si se comparan los resultados se puede observar que para los patrones 2, 3 y 4 las riquezas

que en el caso del patrón 1 la riqueza obtenida por el método de la valoración es sensiblemente inferior a la nominal. Además, este patrón cuando fue cuantificado por HPLC, utilizando el método de Lucena et al. 1996, se vio que la relación racémico:meso era aproximadamente del 20:80 (la relación normal entre los dos isómeros es de 50:50), este hecho, como se podrá comprobar más adelante, puede afectar a la estabilidad del quelato formado y, por lo tanto sobre su capacidad complejante. El EDDMtxA y el *p,p*-EDDHA no son capaces de complejar Fe^{3+} , por lo tanto hubo que utilizar una valoración potenciométrica con electrodos selectivos de Cu^{2+} para determinar su riqueza. De igual forma y para comparar los dos métodos, el fotométrico con Fe^{3+} y el potenciométrico con Cu^{2+} , se determinaron las riquezas del *o,o*-EDDHA y *o,p*-EDDHA utilizando los dos métodos. Como se puede comprobar en la figura 8.1 las riquezas obtenidas por ambos métodos no presentan diferencias significativas, por lo que para productos con alta riqueza ambos métodos pueden ser utilizados. En cambio, cuando la riqueza del producto no es muy alta existen diferencias entre ambos métodos. Gómez-Gallego et al. (2002), cuando determinaron la riqueza de *o,p*-EDDHA vieron que la riqueza con Cu^{2+} era sensiblemente superior a la riqueza obtenida por el método fotométrico con Fe^{3+} , este hecho se debía, posiblemente a la presencia de impurezas inorgánicas que complejaban Cu^{2+} pero no Fe^{3+} . Por lo tanto para este tipo de productos el método fotométrico con Fe^{3+} da una información más exacta de la riqueza del producto.

El método fotométrico que se ha propuesto está basado en el método que utilizara Underwood en 1958 para determinar espectrofotométricamente el Fe^{3+} utilizando EDDHA como agente complejante. El método propuesto por Underwood está basado en la alta estabilidad del quelato EDDHA/ Fe^{3+} formado, el cual desarrolla un color máximo que se mantiene durante un intervalo amplio de pH (2.5-11). El quelato formado presenta una absorción máxima a una longitud de onda alrededor de 480 nm. A este respecto son varios los trabajos en los que se describen la longitud de onda máxima de estos productos. Bannochie and Martell (1989) y Ryskiewich and Boka (1962) encuentran las longitudes de ondas máximas para los isómeros del EDDHA; (485 nm para la mezcla racémica y 480 para el meso). Ahrlund et al. las describe para los isómeros del EDDH4MA (487 nm para el meso-EDDH4MA y 495 nm para el rac-EDDH4MA y para EDDHA (484 nm). La formación del color en este tipo de productos se produce por el enlace Fe-fenolato (Hernández-Apaolaza et al. 1997). Este enlace es típico de este tipo de compuestos por lo que este método se podría emplear para compuesto análogos a

estos, como por ejemplo el caracterizado por L'Eplattenier et al. (1967) el cual tiene una absorción máxima a 485 nm (HBED) y sus análogos (BHTDA a 495 nm (Ahrland et al. 1990). Además el método de HPLC descrito por Lucena et al. (1996) cuantifica los agentes quelantes a 480 nm, por lo tanto esta longitud de onda será la elegida para determinar la riqueza por el método fotométrico.

En el método descrito por Underwood (1958), 5 mg/L era la concentración óptima de Fe^{3+} ya que a esta concentración se cumplía la Ley de Beer y la desviación estándar era tan sólo del 0.5%. De igual forma demostró que este método estaba libre de las interferencias producidas por la presencia de otros metales.

En el método fotométrico propuesto en el presente trabajo todas las valoraciones se realizan a un pH constante de 6 ya que a este pH el quelato de Fe^{3+} está totalmente formado y a este pH es donde el método de HPLC desarrollado por Lucena et al. (1996) cuantifica este tipo de productos. Para evitar interferencias con el pH, éste se mantiene fijo durante toda la valoración con un tampón biológico (MES; $\text{pK}_a = 6,1$), cuya constante de formación con Fe^{3+} es despreciable (Good et al. 1966).

La utilización de valoradores automáticos y un espectrómetro permiten la medida en continua tanto del pH como de la absorbancia, además de proporcionar un alto volumen de datos en cada valoración lo cual produce una mayor exactitud para la determinación del punto final.

No existen diferencias significativas entre las riquezas obtenidas por el método propuesto y las obtenidas por ^1H -RMN, facilitadas por el Profesor Miguel Ángel Sierra ($90 \pm 4\%$). La menor riqueza encontrada para el BDDHA y *p*-XDDHA se piensa que es debida no tanto a la presencia de impurezas como a la menor afinidad de estos agentes quelantes por Fe^{3+} al pH elegido para la valoración. El *o,p*-EDDHA facilitado por Syngenta Crop y el EDDHSA facilitado por DABEER S.A. también poseen riquezas muy elevadas.

Además, con este método también se obtiene de forma casi inmediata las absorptividades de los quelatos férricos. En la figura 8.2 se representan las absorptividades a 480 nm. Este dato se relaciona directamente con el enlace Fe-fenolato. Como los quelatos estudiados por este método tienen dos enlaces Fe-fenolato, las

absortividades obtenidas son del mismo orden de magnitud y similares a las encontradas en la bibliografía para los isómeros *rac*- y *meso*-EDDHA/ Fe^{3+} (Bannochie y Martell, 1989; Ahrlund et al. 1990; Bannochie y Martell, 1990). Las diferencias son debidas al desplazamiento del máximo de absorción. Caso aparte es el *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} , el cual tiene una absortividad aproximadamente la mitad que el *o,o*-EDDHA/ Fe^{3+} . El hidroxilo unido al grupo de benceno en posición *para* respecto a la cadena aminopolicarboxílica no compleja Fe^{3+} , por lo que el Fe^{3+} se une solamente con un grupo fenolato lo que produce la bajada en la absortividad ($2129 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Las absortividades obtenidas por este método nos permiten utilizar este factor como otro parámetro adicional para identificar mismos

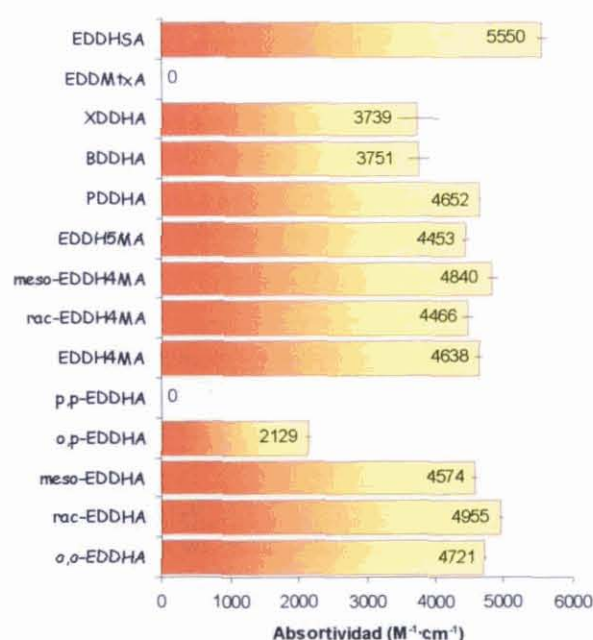


Figura 8.2. Absortividades de los agentes quelantes a 480 nm. Las barra de error representan el intervalo de confianza de tres repeticiones al 95% de confianza.

agentes quelantes. Así el patrón 1 ($4538 \pm 25 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) posee una absortividad similar a la del *meso*-EDDHA ($4574 \pm 53 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) resultado que está de acuerdo con la mayor proporción del isómero *meso*, detectado por HPLC (Lucena et al. 1996). De igual forma los patrones de EDDHA (patrón 3; $4705 \pm 62 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y EDDH4MA (patrón 4; $4671 \pm 63 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) poseen absortividades similares a las correspondientes de los *o,o*-EDDHA y EDDH4MA sintetizados por Sierra et al. 2002). Esto apoya el hecho de que el método de síntesis propuesto por Sierra et al. 2002 produce agentes quelantes de alta pureza y similares a los patrones que se comercializan actualmente.

Hasta ahora los métodos utilizados para obtener la riqueza de estos agentes quelantes de nueva síntesis eran principalmente los métodos espectroscópicos de resonancia (^1H -RMN y ^{13}C -RMN) y los métodos cromatográficos como el desarrollado por Lucena et al. 1996 para cuantificar el EDDHA. La ventaja del método aquí propuesto es que este método sólo cuantifica el agente quelante capaz de producir el color a la

longitud de onda prefijada. Así las impurezas inorgánicas no se cuantificarán con ^1H -RMN y ^{13}C -RMN sólo se detectan impurezas orgánicas, ya que las de origen inorgánico no se detectan. La otra ventaja fundamental es que el patrón que se utiliza para cuantificar es de Fe^{3+} disponible comercialmente mientras que los métodos cromatográficos (Lucena et al. 1996) necesitan patrones de agentes quelantes de referencia para la cuantificación, esto es una ventaja para caracterizar agentes quelantes de nueva síntesis.

Por lo tanto las valoraciones fotométricas con Fe^{3+} son un método complementario adecuado para caracterizar este tipo de agentes quelantes ya que proporcionan información real sobre la capacidad complejante de estos compuestos y cuantifica sólo el agente quelante sin necesidad de patrones de referencia.

8.2. CONSTANTES DE FORMACIÓN

Con el fin de poder utilizar los agentes quelantes para su uso como correctores de carencias de hierro es necesario previamente caracterizar estos ligandos a través de las constantes de protonación primero, para conocer la acidez o basicidad de la molécula, y luego las constantes de estabilidad con los metales que, o bien formen los quelatos más estables capaces de competir con el Fe^{3+} , como puede ser el caso del Cu^{2+} según precedentes bibliográficos (Álvarez-Fernández, 2000) o bien que aunque no formen quelatos muy estables, estos metales estén presentes en concentraciones elevadas en el medio donde se van a aplicar los quelatos férricos (Ca^{2+} y Mg^{2+} en suelos calizos, Lucena et al. 1987^a).

8.2.1. Constantes de protonación

Todos los ligandos que se han estudiado en el presente trabajo son agentes quelantes hexadentados, es decir, compuestos con seis grupos funcionales. Dos fenólicos (K_1^{H} y K_2^{H}), dos aminas secundarias (K_3^{H} y K_4^{H}) y dos carboxílicos (K_5^{H} y K_6^{H}). En la figura 8.3 se esquematiza las diferentes especies predominantes dependiendo del pH.

Debido a la gran basicidad de los grupos fenólicos, los métodos potenciométricos no se pueden utilizar ya que a pHs tan altos ($\text{pH} > 12$) el error de estos métodos es muy grande (Martell y Motekaitis, 1992). Por lo tanto ha sido necesario desarrollar un método fotométrico para determinar las

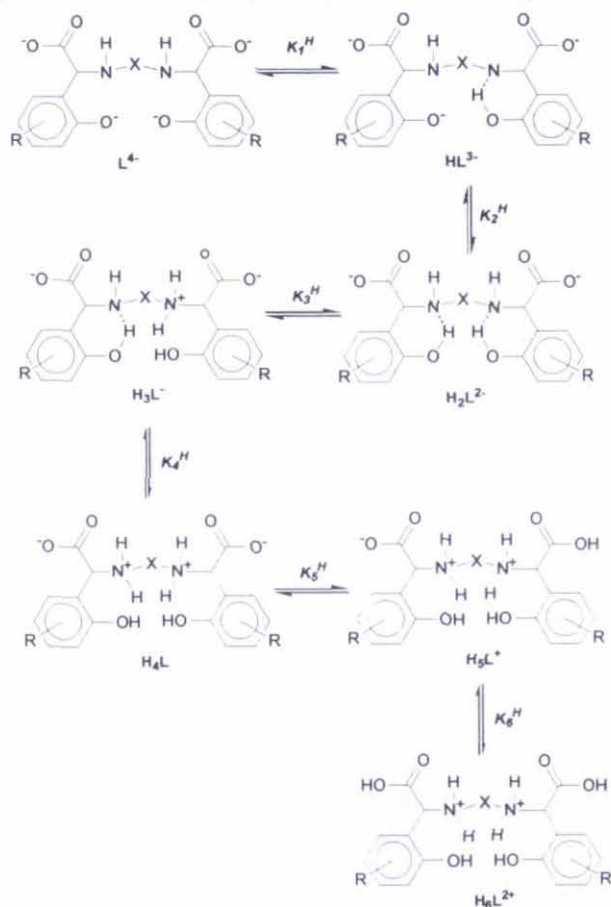


Figura 8.3. Especies formadas según las constantes de protonación.

grande (Martell y Motekaitis, 1992). Por lo tanto ha sido necesario desarrollar un método fotométrico para determinar las constantes de disociación K_1^H y K_2^H (capítulo 3). Frost et al. (1958) estimaron aproximadamente las constantes de protonación del EDDHA correspondientes a los grupos fenólicos ya que no utilizaron métodos fotométricos. En un trabajo posterior Anderegg and L'Eplattenier (1967) utilizaron el método fotométrico para determinar con mayor precisión la disociación de los fenolatos en el EDDHA. Ahrlund et al. 1990 estimaron las mismas constantes para el EDDH4MA. Bannochie and Martell utilizaron el método fotométrico para determinar las

constantes de protonación de los grupos fenólicos de los isómeros del EDDHA. Los resultados obtenidos demuestran la gran precisión y exactitud de este método fotométrico para determinar estas constantes que por otro método no hubiera sido posible.

Las constantes de protonación de las aminas secundarias (K_3^H y K_4^H) se determinan mediante valoraciones potenciométricas del agente quelante, utilizando el método descrito por Martell and Motekaitis (1992) mediante el programa BEST desarrollado por Motekaitis y Martell, (1989). Este programa es similar al desarrollado para los grupos fenólicos pero, en este caso, K_3^H y K_4^H se determinan haciendo mínima la diferencia entre pH teórico y pH experimental variando, por sucesivas iteraciones, las constantes

introducidas como semilla. Bannochie and Martell (1989) postularon que el EDDHA precipitaba a pH inferiores a 5 y por esto no se pueden determinar K_5^H y K_6^H . Sin embargo estos mismos autores en un trabajo posterior (Bannochie and Martell, 1991) determinaron estas constantes de protonación para el agente quelante TMPHPG, ya que aunque precipitaba se podían determinar en la disolución sobresaturada. Debido a que la importancia de estas constantes a pHs agronómicos es prácticamente despreciable y como estos ligandos precipitan a pHs ácidos se decidió no determinarlas, excepto en el caso del EDDHSA que permanece soluble en un amplio margen de pH.

De forma general se puede decir que la sustitución de dos oxígenos carboxílicos (EDTA) por dos oxígenos fenólicos (EDDHA) producen un aumento significativo de la basicidad global de la molécula. Así si se comparan las constantes de protonación del EDDHA determinadas por Anderegg and L'Eplattenier (1967) con las del EDTA determinadas por da Silva and Simoes (1968), los grupos funcionales más básicos del EDDHA, los oxígenos fenólicos, se disocian a unos pHs de 11.68 y 10.24 mientras los del EDTA, que corresponden a las aminas secundarias, se disocian a unos pHs de 10.25 y 6.18 respectivamente. Además Frost et al. (1958) explicaron cómo las interacciones entre los oxígenos fenólicos y las aminas en el EDDHA (8.64 y 6.32) afectan también sobre los pKas de los nitrógenos cuando se comparan con los del EDTA (9.60 y 6.22) y con los del EDDA (9.46 y 6.42). Es importante tener en cuenta este hecho ya que afectará, no sólo sobre la acidez o basicidad del agente quelante sino sobre la capacidad de formar quelatos más o menos estables.

8.2.1.1. Efecto de la presencia de grupos funcionales en el anillo bencénico

La presencia de grupos metilos en diferentes posiciones en el anillo de benceno (posición 4 y 5 respecto a la cadena aminopolicarboxílica) no afecta de forma significativa sobre las constantes de protonación de los agentes quelantes. Estos resultados están de acuerdo con los presentados por Ahrlund et al. (1990) para las constantes de protonación del EDDH4MA, aunque, como se ha comentado anteriormente estos autores sólo hicieron una estimación aproximada de las constantes de los grupos fenólicos usando métodos potenciométricos. Si se comparan las constantes de disociación del fenol ($pK_a = 10.00$) con las del 3-metilfenol ($pK_a = 10.09$) y 4-metilfenol ($pK_a = 10.26$) se puede observar un ligero aumento de la basicidad cuando el metilo se coloca en posición para respecto al grupo hidroxilo. Esta ligera basicidad también se puede observar en la K_4^H

correspondiente al EDDH5MA aunque los procesos de interacción entre los grupos fenólicos y las aminas (mediante puentes de H^+ , figura 8.3) atenúan bastante esta tendencia. Además es predecible que la presencia de los grupos metilo no afecten de forma significativa sobre la solubilidad del EDDH4MA y 5MA con respecto al EDDHA. En cambio, la presencia de dos grupos sulfónicos, en el agente quelante EDDHSA, sí que afecta sobre la acidez de la molécula cuando se compara con la del EDDHA. Al igual que antes, esto se puede explicar fácilmente si se comparan los pK_a s de los restos fenol ($pK_a = 10.00$) con los del fenol del *para*-hidroxibencenosulfónico ($pK_a = 8.8$ Sawada and Kato (1970)). Este aumento de acidez del resto *p*-hidroxibencenosulfónico afectará sobre la acidez del EDDHSA, como así reflejan las constantes de protonación. Además de afectar sobre la acidez también afecta sobre la solubilidad ya que la presencia de dos grupos sulfónicos ($pK_a = 1.40$) hacen que el EDDHSA sea más soluble y esto permite determinar las constantes de protonación de los oxígenos carboxílicos con gran precisión.

8.2.1.2. Efecto de la longitud y estructura de las cadenas hidrocarbonadas centrales

Bannochie and Martell (1991) comprobaron que si se aumentaba la cadena carbonada en un metilo, es decir pasar de un puente etilendiamino (EDDHA) a un puente de propilendiamino (o trimetilendiamino) (TMPHPG) esto producía una mayor independencia entre las aminas y los oxígenos fenólicos produciendo una menor repulsión y por lo tanto un aumento de la basicidad. Este mismo hecho ocurre cuando se va aumentando los grupos metilen en la cadena central desde 2 (EDDHA) hasta 4 (BDDHA). En cambio la introducción de un grupo *p*-xilileno entre los grupos aminos produce un ligero descenso en la basicidad de los nitrógenos amínicos llegando a niveles próximos al EDDHA. Esta teoría coincide con los datos experimentales presentes en el capítulo 5. La basicidad de la molécula entera aumenta en los agentes quelantes BDDHA y PDDHA pero para el *p*-XDDHA se produce una disminución de la basicidad debido a la presencia del grupo benceno. Esto es debido a que la presencia de un grupo benceno entre los dos grupos aminos produce un efecto de estabilización de los H^+ que se unen a los grupos aminos y hace estas uniones sean más estables. Ahrland et al. (1990) encontraron una tendencia similar cuando compararon las constantes de protonación del HBED con su análogo BHTDA (ácido trimetiléndiamino- N,N' -(*o*-hidroxifenil)- N,N' -(diacético)), con su análogo por la adición de un metilen más entre los dos nitrógenos.

Es predecible que este aumento de la basicidad tenga cierta repercusión sobre la quelación de metales.

8.2.1.3. Efecto de la posición de los grupos fenolatos

Como se ha señalado anteriormente, para que estos quelatos sean eficaces a pHs alcalinos es fundamental la presencia de grupos fenolatos en posición *orto* respecto a la cadena aminopolicarboxílica. Si se compara la sustitución progresiva de los dos fenolatos desde la posición *orto* hasta la posición *para*: *o,o*-EDDHA, *o,p*-EDDHA y *p,p*-EDDHA, se puede comprobar que la basicidad total de los agentes quelantes va disminuyendo. Esto es lógico ya que las interacciones entre los grupos amino y los oxígenos de los fenolatos no existen cuando éstos se colocan en posición *para* (véase figura 8.3) llegando las constantes de disociación de los grupos fenólicos del *p,p*-EDDHA ($pK_a = 9.99$ y 9.11) a ser del mismo orden que las de los restos fenol ($pK_a = 10.0$). El agente quelante *o,p*-EDDHA presenta un grupo fenólico en posición *orto* y otro en posición *para* por lo tanto las constantes de protonación de sus fenolatos ($pK_a = 11.18$ y 10.18) serán intermedias a las de los otros isómeros posicionales del EDDHA. La presencia de grupos metoxi (EDDMtxA) en vez de grupos hidroxilo produce que el resto anisol (éter fenilmetílico ó metoxibenceno) sea muy estable ya que la mayoría de los ácidos y álcalis no los afectan (sólo con yodhídrico concentrado o ácido bromhídrico o el calentamiento con hidrocloreuro de piridina a $170-240^\circ\text{C}$ logran la hidrólisis del grupo metoxi). Por lo tanto en este agente quelante sólo se pueden determinar las constantes de protonación correspondiente a las aminas.

8.2.1.4. Efecto de la isomería geométrica

Bannochie and Martell (1989) y Ahrlund et al. (1990) determinaron las constantes de protonación para los isómeros del EDDHA y EDDH4MA respectivamente. Ambos demostraron que las diferencias encontradas entre ambos isómeros eran muy pequeñas, si bien el *rac*-EDDHA y el *meso*-EDDH4MA presentaban una mayor basicidad que los otros dos isómeros. Esta misma tendencia se ha encontrado en este trabajo de tal forma que el *rac*-EDDHA y *meso*-EDDH4MA ($\text{Log } K_{LH_4} = 37.67$ y 37.79 respectivamente) presentan basicidades mayores que el *meso*-EDDHA y *rac*-EDDH4MA ($\text{Log } K_{LH_4} = 37.53$ y 37.29 respectivamente). Además se ve que las diferencias entre los isómeros de un

mismo agente quelante son mayores entre los del EDDH4MA que entre los del EDDHA. La presencia de un grupo metilo en el anillo de benceno parece producir una mayor diferencia en la estabilidad frente al pH de los isómeros. Bannochie and Martell (1991) determinaron las constantes de protonación de los isómeros del TMPHPG y observaron que cuando se aumentaba la longitud de la cadena carbonada las diferencias entre los isómeros disminuía.

8.2.2. Constantes de estabilidad de los complejos con Ca^{2+} y Mg^{2+}

En suelos calizos la presencia de metales tales como Ca^{2+} y Mg^{2+} pueden llegar a competir e incluso a desplazar el Fe^{3+} de los quelatos férricos afectando negativamente sobre la estabilidad de estos quelatos y por lo tanto, sobre su eficacia. En estudios realizados sobre el EDTA se ha visto que, en suelos calizos, el Ca^{2+} desplaza completamente al Fe^{3+} a partir de un pH de 7 (Lindsay, 1979).

Si se comparan las constantes de estabilidad del Ca^{2+} y del Mg^{2+} para agentes quelantes análogos al EDTA (DTPA, CDTA, EGTA, HEDTA) (Lindsay, 1979) con las del EDDHA (Frost et al., 1958) u otros agentes quelantes fenólicos análogos (HBED; L'Eplattenier et al. 1967) la primera conclusión que se aprecia es que los agentes quelantes fenólicos tienen una mayor afinidad por Mg^{2+} mientras que los análogos al EDTA son más estables con Ca^{2+} . Este mismo hecho se ha observado para todos los agentes quelantes estudiados en el presente trabajo. La explicación que se ha dado reside en el diseño de los agentes quelantes y en la naturaleza de los metales involucrados. Así el Ca^{2+} , debido a su tamaño y carga es más afín a agentes quelantes con gran número de ácidos carboxílicos (EDTA) (Hanckock and Martell, 1989) y en los que la "cavidad" formada por el metal y el agente quelante es mayor. En cambio el Mg^{2+} , al ser más pequeño y por lo tanto con más carga, prefiere moléculas con mayor basicidad y en las que la "cavidad" que se forme sea menor (EDDHA). Por lo tanto, a la hora de estudiar y diseñar la afinidad de un metal por un agente quelante y viceversa hay que considerar que son varios los factores a tener en cuenta: número y naturaleza de los grupos funcionales del agente quelante, tamaño y carga del metal y estructura global del agente quelante.

Tanto para el Ca^{2+} como para el Mg^{2+} se han determinado las constantes de estabilidad de las especies ML^{2-} , MHL^- y MH_2L . Para poder comparar la estabilidad entre los diferentes agentes quelantes se utilizarán las constantes de la especie ML^{2-} que

corresponde al metal unido a los nitrógenos y a los grupos fenólicos. A medida que el pH va disminuyendo el metal se unirá a los grupos carboxílicos, protonándose los grupos fenólicos para formar MHL^- ($ML^{2-} + H^+ \rightarrow MHL^-$) y a pH más ácido MH_2L ($MHL^- + H^+ \rightarrow MH_2L$). Otro parámetro que demuestra la mayor afinidad por el Mg^{2+} es la mayor concentración de H^+ que son necesarios en el medio para romper los enlaces y formarse la siguiente especie, es decir las especies protonadas del Mg^{2+} son predominantes a pHs más bajos que las especies protonadas del Ca^{2+} .

8.2.2.1. Efecto de la presencia de grupos funcionales en el anillo bencénico

Para el caso de la complejación de Ca^{2+} no existe una relación clara entre la sustitución de un grupo metilo dentro del anillo de benceno en diferentes posiciones y la estabilidad del quelato cálcico formado. De forma general parece ser que la presencia de un metilo en el anillo bencénico produce una menor afinidad por el Ca^{2+} , cuando se compara con el EDDHA, aunque las diferencias son muy pequeñas. En cambio, si se ven diferencias claras cuando se introduce un grupo más reactivo (grupo sulfónico del EDDHSA) ya que produce una menor afinidad por el Ca^{2+} . Como se ha visto en las constantes de protonación, la mayor acidez de la molécula EDDHSA por la presencia de los grupos sulfonilos produce un descenso en la afinidad por metales tales como Ca^{2+} .

Para el caso del Mg^{2+} y debido a la mayor afinidad por formar quelatos más estables, las tendencias observadas para el Ca^{2+} ahora se hacen más evidente. El Mg^{2+} presenta una mayor afinidad por EDDHA que por EDDH4MA y EDDH5MA, con lo cual se ve que la presencia de un grupo metilo produce una disminución en la estabilidad del quelato con Mg^{2+} . En principio este resultado puede resultar contradictorio con lo explicado hasta el momento ya que, como se ha visto en el apartado de las constantes de protonación, la presencia de grupos metilos teóricamente aumenta la basicidad del agente quelante y, por lo tanto, favorece la unión con ácidos más fuertes como el Mg^{2+} . Pero hay que tener en cuenta que, además de la naturaleza de los grupos funcionales también son importantes los impedimentos estéricos; es posible que la presencia de un grupo metilo favorezca menos la formación del quelato EDDH4MA/ Mg^{2+} que el correspondiente con EDDHA. Para el caso del EDDHSA ocurre el mismo hecho que ocurriría con el calcio. La presencia de grupos sulfónicos produce un descenso en la basicidad de la molécula del EDDHSA y por lo tanto se produce una bajada en la estabilidad del quelato de Mg^{2+} .

En general se puede afirmar que la presencia de grupos metilos y sobre todo la presencia de grupos sulfónicos producen una disminución en la afinidad de este tipo de agentes quelantes por Ca^{2+} y Mg^{2+} .

8.2.2.2. Efecto de la longitud y estructura de las cadenas hidrocarbonadas centrales

De forma resumida se puede decir que la adición de grupos metilen dentro de la cadena hidrocarbonada central que une los nitrógenos afecta más sobre la afinidad por formar quelatos de Mg^{2+} que para formar los quelatos de Ca^{2+} . Hancock and Martell (1989) demostraron que para agentes quelantes análogos al EDTA, el aumento de la longitud de la cadena hidrocarbonada afectaba más sobre los metales grandes que sobre los metales pequeños. Como se ha visto anteriormente el comportamiento de estos agentes quelantes es contrario al comportamiento de los agentes quelantes análogos al EDDHA. El aumento de la cadena carbonada produce un aumento en la "cavidad" donde se encuentra el metal, por lo tanto es predecible que este aumento provoque una disminución de la estabilidad más acusada en metales pequeños (Mg^{2+}) que sobre metales más grandes (Ca^{2+}).

8.2.2.3. Efecto de la posición de los grupos fenolatos

Considerando la especie desprotonada ML^{2-} ésta es tanto más estable cuando el metal se une a los oxígenos fenólicos en posición *orto* y a los nitrógenos amínicos (ML^{2-}). Por lo tanto la sustitución de estos grupos o bien a una posición lejana (posición *para*) o bien la sustitución por unos grupos funcionales de difícil disociación (grupos metoxi) provocan dos efectos. El primero es la disminución sensible de la afinidad por Ca^{2+} y Mg^{2+} cuando se comparan con el *o,o*-EDDHA. Además esta disminución es mayor para el *p,p*-EDDHA y el EDDMtxA que para el *o,p*-EDDHA ya que este último posee un fenolato en posición *orto* el cual estabiliza la formación de quelatos. El segundo efecto es que el *p,p*-EDDHA y el EDDMtxA presentan una afinidad similar por el Ca^{2+} que por el Mg^{2+} ya que las consideraciones del tamaño de la "cavidad" en presencia de los dos fenolatos aquí ya no son aplicables.

8.2.2.4. Efecto de la isomería geométrica

De forma general se ve que el *rac*-EDDHA presenta complejos de mayor estabilidad con Ca^{2+} , aunque no significativamente, y sobre todo con el Mg^{2+} que los de *meso*-EDDHA. Para el caso de los isómeros del EDDH4MA no existen diferencias de afinidad por el Ca^{2+} pero el *meso*-EDDH4MA presenta una mayor afinidad por Mg^{2+} que el *rac*-EDDH4MA, además esta diferencia es mayor que para los isómeros EDDHA. La mayor basicidad de los isómeros *rac*-EDDHA y *meso*-EDDH4MA producen un aumento sobre la estabilidad por de Mg^{2+} . Bannochie and Martell (1989) estudiaron las diferentes constantes de estabilidad de los complejos de los diferentes isómeros con varios metales trivalentes (In^{3+} , Ga^{3+} y Fe^{3+}) pero no con los metales que nos ocupan en esta sección. Parece claro que existe una relación entre el comportamiento frente a H^+ y frente a cationes tales como Ca^{2+} y Mg^{2+} de tal forma que una mayor basicidad del agente quelantes tiende a formar quelatos más estables con metales más ácidos.

8.2.3. Constantes de estabilidad con Cu^{2+} y Fe^{3+}

Frost et al. (1958), empleando el método potenciométrico, observaron que la estabilidad de EDDHA/ Fe^{3+} era muy alta ($\text{Log } K_{\text{FeL}} > 30$) ya que los cuatro protones del ligando se desplazan en una sola etapa según el equilibrio:



Posteriormente Anderegg and L'Eplattenier (1967) y L'Eplattenier et al. (1967) utilizaron el método de competencia de ligandos para determinar las constantes de protonación del EDDHA/ Fe^{3+} y HBED/ Fe^{3+} respectivamente. Este método está basado en poner el quelato férrico en presencia de un agente quelante con una afinidad comparable y después de establecerse el equilibrio determinar colorimétricamente el desplazamiento del equilibrio. Este método fue utilizado por Ahrlund et al. (1990) para calcular las constantes de estabilidad del EDDH4MA/ Fe^{3+} . Los principales inconvenientes de este método es que utilizas como competidor un agente quelante con una constante de estabilidad conocida (por ejemplo EDTA) y con un error intrínseco. Además, si se utiliza EDTA como el agente quelante competidor, el pH donde se produzca el equilibrio es muy importante ya que, como se ha visto anteriormente, el EDTA es más estable a pHs ácidos

mientras que el EDDHA es más estable a pHs básicos. Igualmente la reacciones de competencia pueden llegar a ser muy lentas y no alcanzarse el equilibrio en las condiciones experimentales. Posteriormente Bannochie and Martell determinaron las constantes de estabilidad de los isómeros EDDHA/ Fe^{3+} utilizando métodos fotométricos y potenciométrico separadamente.

Ante la falta de un método estándar, como primer objetivo se planteó desarrollar un método para determinar las constantes de estabilidad de Fe^{3+} con los agentes quelantes y de esta forma poder comparar las estabilidades calculadas por un mismo método. El método consiste en medir la formación del quelato férrico, mediante el desarrollo de color a 480 nm a lo largo de un intervalo de pH (2-12). Para la determinación de las constantes se utilizan los equilibrios de protonación, los equilibrios con otras especies hidroxiladas que pudieran afectar a la constante final del quelato férrico y las absorptividades de cada especie a determinar. Para el cálculo de las constantes de estabilidad de Fe^{3+} con los diferentes agentes quelantes se procede a realizar una minimización usando la herramienta Solver de Microsoft Excel® y utilizando los parámetros descritos por Maleki et al. (1999). Para ello se minimiza la diferencia cuadrática entre la Absorbancia experimental de la valoración y la Absorbancia teórica, variando las constantes de estabilidad y los coeficientes de extinción molar de las especies, por sucesivas iteraciones. De esta forma se calculan las constantes de estabilidad del Fe^{3+} así como de las especies protonadas (FeH_nL) y especies hidroxiladas ($\text{Fe}(\text{OH})_n\text{L}$).

Usando la misma metodología y observando los cambios de color que el quelato EDDHA/ Cu^{2+} experimenta dependiendo de la zona de pH descritos por Frost et al. (1958) y Patch et al (1982) se modificó el método para determinar las constantes de estabilidad con Cu^{2+} . En este caso la formación del color se medía mediante el desarrollo de color a 650 nm y así se determinaron las constantes de todas las especies formadas, incluso las protonadas (CuH_nL).

Con el objetivo de comprobar la exactitud de los métodos propuestos se han comparado las constantes de estabilidad aquí calculadas con las revisadas bibliográficamente para EDDHA/ Fe^{3+} (Anderegg and L'Eplattenier 1967), *rac*- y *meso*-EDDHA/ Fe^{3+} y / Cu^{2+} (Bannochie and Martell, 1989), *rac*- y *meso*-EDDH4MA/ Fe^{3+} (Ahrland

et al. 1990). Los resultados demuestran que los métodos propuestos son muy válidos para calcular las constantes de estabilidad de este tipo de ligandos.

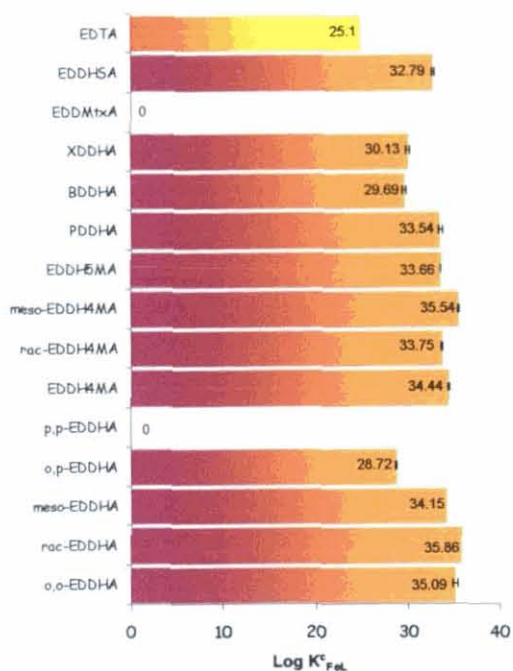


Figura 8.4. Log K^c_{FeL} de los agentes quelantes. $T^a = 25^\circ\text{C}$; $\mu = 0.1\text{M}$ (NaCl). Barras de error representan el intervalo de confianza sobre tres repeticiones al 95%.

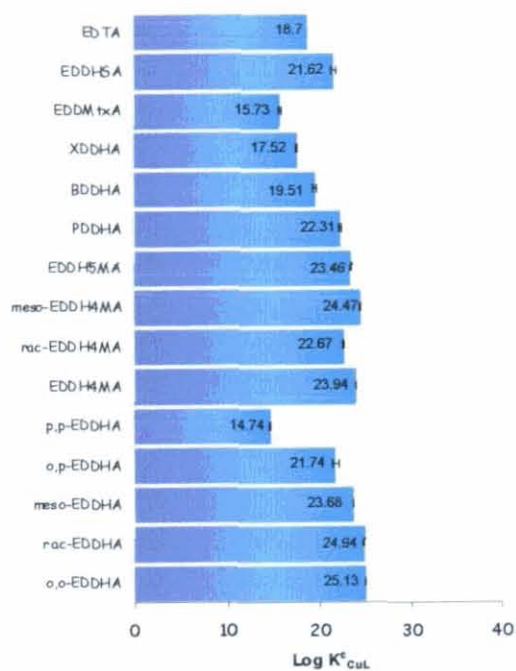


Figura 8.5. Log K^c_{CuL} de los agentes quelantes. $T^a = 25^\circ\text{C}$; $\mu = 0.1\text{M}$ (NaCl). Barras de error representan el intervalo de confianza sobre tres repeticiones al 95%.

El Fe^{3+} , cuando forma el quelato férrico, orienta a los seis grupos funcionales del agente quelante de modo que adquieren una disposición octaédrica alrededor del Fe^{3+} como punto central. Esta conformación es la que hace tan estable la unión de este metal con este tipo de agentes quelantes ya que el Fe^{3+} está protegido contra procesos que pudieran romper el quelato. La especie hidroxilada se forma mediante la ruptura de un enlace entre el Fe^{3+} y un oxígeno carboxílico de modo que la posición libre del Fe^{3+} se coordina con el OH y la forma protonada se produce cuando un grupo fenólico no está todavía unido al Fe^{3+} y la posición vacante del Fe^{3+} está ocupada por una molécula de agua (capítulo 4, esquema 4.4.). La mayor estabilidad de este tipo de agentes quelantes frente al EDTA y análogos (Lindsay, 1979) se debe principalmente a la presencia de los dos oxígenos fenolatos en vez de los dos oxígenos carboxílicos del EDTA (Hanckock and Martell, 1989) (Figura 8.4.). La mayor basicidad de los grupos fenólicos confieren a estos

agentes quelantes una gran afinidad por metales clasificados como ácidos fuertes (según Pearson, 1973) (p. ej. Fe^{3+} , Al^{3+}).

En el caso del quelato de Cu^{2+} , este metal también adquiere una coordinación octaédrica aunque, las dos posiciones polares se encuentran ocupadas por moléculas de agua. Cuando el Cu^{2+} se une a los grupos carboxílicos y las aminas, el quelato tiene un máximo de absorción a 650 nm, en cambio cuando se une a los oxígenos fenólicos el máximo de absorción se desplaza hasta 375 nm (Patch et al. 1982 y Frost et al. 1958).

En este caso al tratarse el Cu^{2+} de un ácido no tan fuerte como el Fe^{3+} (Pearson, 1973) cuando se compara la estabilidad del EDTA y sus análogos con la del EDDHA y sus análogos la diferencia no es tan acusada como en el caso del Fe^{3+} (figura 8.5).

8.2.3.1. Efecto de la presencia de grupos funcionales en el anillo bencénico

La sustitución de un grupo metilo en la posición 4 (EDDH4MA) o 5 (EDDH5MA) en el anillo de benceno produce una ligera disminución en las constantes de estabilidad de los quelatos de Fe^{3+} (figura 8.4) y de Cu^{2+} (figura 8.5) cuando se comparan con las del EDDHA. El motivo de tal descenso hay que buscarlo en impedimentos de tipo estérico ya que ambos quelatos tienen el Fe^{3+} unido a los seis grupos funcionales en disposición octaédrica y las diferencias ácido-base de tales ligandos son muy pequeñas. Por lo tanto la formación de los quelatos EDDH4MA/ Fe^{3+} y EDDH5MA/ Fe^{3+} está ligeramente más impedida que la del EDDHA/ Fe^{3+} . Particularmente se observa que la presencia del grupo metilo en la posición 5 produce un ligero descenso adicional de la estabilidad con Fe^{3+} . Sin embargo el descenso más significativo sucede cuando se compara el EDDHSA/ Fe^{3+} con el EDDHA/ Fe^{3+} (figura 8.4). La presencia de los grupos sulfonilos produce un descenso en la estabilidad con Fe^{3+} , esto puede ser debido al descenso en la basicidad de la molécula de EDDHSA, como se comentó en el apartado 8.2.1. de las constantes de protonación, lo cual hace que este agente quelante sea más efectivo a pHs más bajos. Clark et al. (1988) y Martell et al. (1989) encontraron la misma tendencia cuando compararon el HBED (agente quelante análogo al EDDHA) con el SHBED (agente quelante análogo al EDDHSA).

En este punto es muy importante tener en cuenta las cargas de los agentes quelantes. Todos los agentes quelantes del presente trabajo que son capaces de complejar Fe^{3+} son ligandos considerados L^{4-} excepto el EDDHSA que debido a la

presencia de dos cargas negativas adicionales, se debe considerar L^{6-} . Esta diferencia de cargas es importante cuando hay que transformar las constantes de concentraciones (K^c) o mixtas (K^m) a constantes en actividades (K^0) utilizando la ecuación de Davies (Lindsay, 1979). De esta forma se reducen las diferencias entre el EDDHA/ Fe^{3+} ($\log K^0_{FeL} = 37.66$) y el EDDHSA/ Fe^{3+} ($\log K^0_{FeL} = 36.64$).

Petree y Stutts (1975) describen que el EDDHSA se puede combinar con el Fe^{3+} en una proporción molar 1:2 (ligando:Fe). Según estos autores en el EDDHSA/ Fe^{3+} un átomo de Fe^{3+} se coordina octaédricamente con los dos grupos carboxilos, los dos grupos fenólicos y los dos grupo amino del ligando, pero además otro átomo de Fe se une a los dos grupos sulfónicos. En las constantes de estabilidad determinadas por el método fotométrico no hay evidencias de la formación de dímeros que comparte el Fe^{3+} (estequiometría 2:3) ni de complejos 1:2. Esto puede ser debido a las concentraciones tan bajas en las que se está trabajando ($10^{-4}M$) o porque no hay un exceso de Fe^{3+} en el medio ya que se ha considerado estequiometría 1:1. De todas formas, de existir complejos de estequiometría superior a 1:1 serían tan débiles que su implicación agronómica sería nula.

En el caso del Cu^{2+} ocurre la misma tendencia que para el Fe^{3+} (figura 8.5). El EDDHA/ Cu^{2+} presenta una mayor estabilidad que cuando se sustituye el grupo metilo en posición 4 y sobre todo en posición 5. La mayor bajada en la estabilidad se produce con el EDDHSA/ Cu^{2+} aunque, como en el caso del Fe^{3+} estas diferencias se reducen cuando se expresan las constantes en forma de actividades. Este hecho confirma que la disminución en la estabilidad es debida a un impedimento estérico ya que las propiedades químicas del Cu^{2+} y del Fe^{3+} son distintas y en cambio el comportamiento es paralelo.

8.2.3.2. Efecto de la longitud y estructura de las cadenas hidrocarbonadas centrales

A medida que aumenta el número de grupos metilen en la cadena policarbonada, de 2 (EDDHA) a 4 (BDDHA), se produce un descenso en la estabilidad del quelato férrico (figura 8.4) y del quelato de Cu^{2+} (figura 8.5) formados. Además se puede ver que este descenso es mayor que en el caso de la sustitución de grupos en el anillo de benceno. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados por White (1988) cuando sintetizó quelatos férricos para su uso como radiomarcadores. Este autor comprobó que

cuando se alarga la cadena de metilenos que unían los grupos aminos, de 2 a 5, era la cadena de 2 metilenos (etilendiamino) la que producía los quelatos más estables. Bannochie and Martell (1991) explican la diferencia de estabilidades entre TMPHPG (puente **propilendiamino**) y EDDHA (puente **etilendiamino**) en base a los números de anillos que forma el metal con el agente quelante en el plano ecuatorial. Así EDDHA forma un anillo de cinco miembros entre el Fe^{3+} y los dos nitrógenos mientras que el PDDHA y el BDDHA lo forman de seis y siete miembros respectivamente. En este caso el mayor descenso se produce al pasar al anillo de siete miembros ya que la distancia entre los grupos aminos es grande y la tensión molecular entre los enlaces del metal y del agente quelante aumentan. Además la formación de un anillo central con más átomos afecta a la estabilidad de los otros anillos laterales que se forman. Ahrlund et al. (1990) encontró un resultado similar cuando comparó la constante de estabilidad del HBED/ Fe^{3+} ($\log K_{\text{FeL}} = 39.68$) con la de su análogo con un puente de tres carbonos; BHTDA/ Fe^{3+} ($\log K_{\text{FeL}} = 37.9$).

En el caso del *p*-XDDHA era predecible que debido a la gran separación entre los nitrógenos tuviera muchas dificultades para quelar sobre todo Fe^{3+} . Se observa un

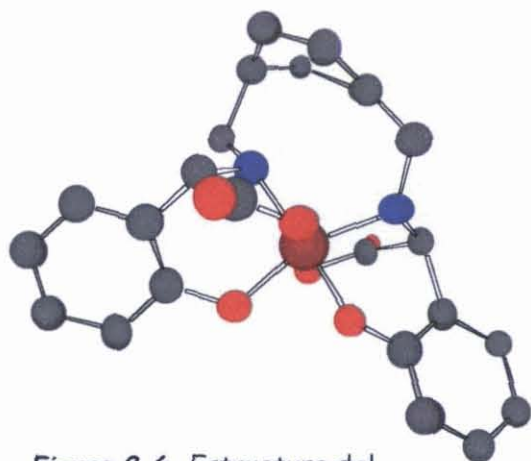


Figura 8.6. Estructura del *rac-p*-XDDHA/ Fe^{3+}

descenso significativo con respecto al EDDHA/ Fe^{3+} pero sin embargo la constante de estabilidad es superior a la del BDDHA/ Fe^{3+} . Para poder quelar el Fe^{3+} el anillo de benceno se debe deformar tal y como indica la modelización molecular efectuada con CS Chem3D Pro® (figura 8.6). Además, debido a la cercanía espacial sería lógico pensar que existe una cierta atracción electrostática entre la nube electrónica del benceno y el Fe^{3+} , o incluso un enlace covalente deslocalizado como

sucede con los ferrocenos. En el caso del *p*-XDDHA/ Cu^{2+} se observó que a pHs inferiores a 8 se producía un precipitado indicando que el quelato de Cu^{2+} se había roto debido a la baja estabilidad cuando el Cu^{2+} no está unido a los oxígenos fenólicos.

8.2.3.3. Efecto de la posición de los grupos fenolatos

Como se comentó en el apartado de riqueza, el *p,p*-EDDDHA (A en figura 8.7) y el EDDMtxA (B en figura 8.7) no son capaces de quelar Fe^{3+} debido a la lejanía de los oxígenos fenólicos o a la presencia de grupos difícilmente dissociables (metoxi).

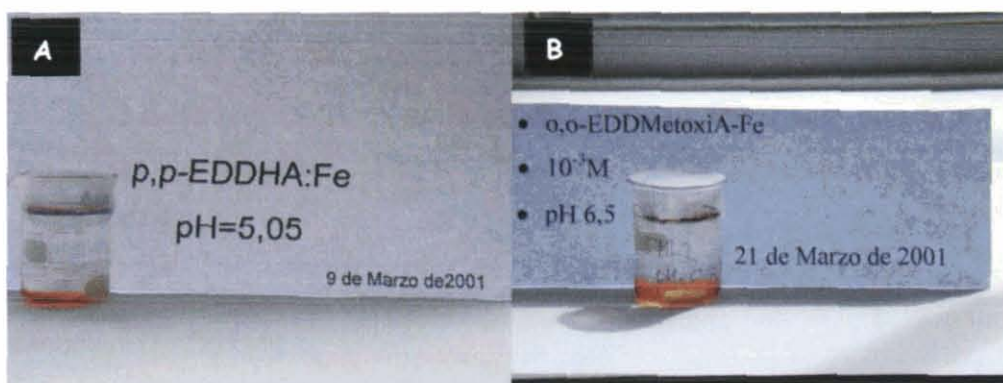


Figura 8.7. Disoluciones de A) EDDMtxA y B) *p,p*-EDDHA a las cuales se añadió una cantidad equimolecular de Fe^{3+} . En el fondo del vaso de precipitados se puede observar el $\text{Fe}(\text{OH})_3$ precipitado.

Igualmente el complejo de Cu^{2+} con estos agentes quelantes se limita a la unión con los nitrógenos y los oxígenos carboxílicos. Es por esto que presentan una constante de estabilidad con Cu^{2+} similar a la del EDDA ($\text{Log } K_{\text{CuL}} = 16.2$; Frost et al. 1958).

El caso del *o,p*-EDDHA ha sido profusamente discutido en el capítulo 6. El *o,p*-EDDHA sólo es capaz de ocupar cinco de las seis posiciones octaédrica presentes en el Fe^{3+} . Este hecho produce que la constante de estabilidad del quelato sea significativamente menor que la de su isómero posicional *o,o*-EDDHA. Además al dejar un posición vacante su reactividad frente al pH aumenta y por eso se forman la especies protonadas a pHs inferiores a 6.30 y la especie hidroxilada a pH superiores a 9.30 (coincidiendo prácticamente con el pKa del fenol).

8.2.3.4. Efecto de la isomería geométrica

La secuencia de las constantes de estabilidad frente al Fe^{3+} para los isómeros del EDDHA y del EDDHMA coinciden con las encontradas por Bannochie and Martell (1989) y Ahrlund et al. (1990). El *rac*-EDDHA/ Fe^{3+} y el *meso*-EDDHA/ Fe^{3+} son los quelatos férricos más estables, mientras que el *meso*-EDDHA/ Fe^{3+} y el *rac*-EDDH4MA/ Fe^{3+} presentan la estabilidad más baja. Bannochie and Martell (1989 y 1990) estudiaron como

la conformación espacial del *rac*-EDDHA/ Fe^{3+} con los dos grupos fenoles y las dos aminas en el plano ecuatorial (conformación [6,5,6]) formaban una estructura más estable que la *meso*-EDDHA/ Fe^{3+} la cual tenía en el plano ecuatorial los dos aminos, un fenol y un carboxílico (conformación [5,5,6]). Además estos autores comprobaron que la otra posible conformación de la mezcla racémica, con los dos grupos aminos y los dos carboxílicos en el plano ecuatorial y, por lo tanto los grupos fenólicos en el plano axial (conformación [5,5,5], contribuye en menos del 0,5% de la mezcla racémica (Bernauer, 1976; Bailey et al., 1981).

En el caso de los isómeros EDDHMA todavía no está tan claro porque ocurre lo contrario que con los isómeros del EDDHA. Así (García-Minas et al., 2002) asignaron los picos del HPLC en el mismo orden que para el EDDHA ya que no había evidencias de que un grupo metilo afectase en el orden de estabilidad de los isómeros. Ahrlund et al (1990) encontraron la misma secuencia que en el presente trabajo, además Bannochie and Martell (1991) también encontraron la misma secuencia cuando analizaron los isómeros del TMPHPG. Parece ser que en el caso del EDDHMA, la conformación de la mezcla racémica que se produce es la [5,5,5] aquella que en el caso del EDDHA no se producía en la naturaleza. Esta conformación con los grupos carboxílicos y los aminos en el plano ecuatorial y los fenólicos en el axial posee un mayor impedimento molecular que el isómero *meso*-EDDH4MA/ Fe^{3+} . Con esta explicación se entendería porque la forma *meso*-EDDH4MA/ Fe^{3+} es más estable que la *rac*-EDDH4MA/ Fe^{3+} .

Además, tal y como viene ocurriendo para las constantes de protonación y de Mg^{2+} las diferencias entre las estabilidades de los isómeros son mayores para el caso del EDDH4MA que para el EDDHA, en ambos sistemas (Fe^{3+} y Cu^{2+}).

8.3. pFe^{3+} y pCu^{2+}

Motekaitis et al. (1990) proponen el cálculo de pM ($\text{pM} = -\log[\text{M}^{n+}]$) como método para predecir el comportamiento de los agentes quelantes a los pHs fisiológicos ya que las constantes de estabilidad por sí solas no proporcionan un dato objetivo de la estabilidad de ese compuesto. El método consiste en medir los diferentes grados de competición entre los H^+ con el metal a un pH dado. Se basan en que los grupos donadores básicos presentan muy altas afinidades por los metales mientras que poseen bajas afinidades por

H⁺. Así los valores de pM sirven para definir el "potencial químico" del metal acuoso. Para dicha metodología lo que usan son las constantes de protonación y las constantes de estabilidad del metal para el cual se determina el pM. Las constantes se introducen como K^c a una temperatura dada y a una fuerza iónica fija. Así, a cada valor de pH le corresponde su valor de pM. Cuanto mayor es el valor de pM, menor concentración queda libre del ion, y mayor es la afinidad del agente quelante por el metal. Esta metodología ha sido aplicada por Bannochie and Martell (1989) para determinar los valores, entre otros, de pFe³⁺ de los isómeros del EDDHA. Igualmente Bannochie and Martell (1991) aplicaron este modelo para determinar y comparar los valores de los isómero de TMPHPG con los del EDDHA. Hider (2000) aplica el parámetro pM como índice general de conocimiento del modo de acción de los fitosideróforos y nicotianamina en cuanto a biodisponibilidad de hierro en diferentes suelos con relación al pH, competición de iones y comparación con los quelatos sintéticos. Este parámetro lo aplica después de determinar la estructura del quelato y las propiedades resultantes del complejo de hierro mediante la estabilidad cinética y termodinámica. En el presente trabajo también se utiliza esta metodología para calcular los valores de pFe³⁺ y pCu²⁺ en un intervalo de pH de 4 - 12 de todos los agentes quelantes estudiados (denominada modelo 1 en los capítulos 4, 5 y 6 en los apartados del cálculo de pM) para determinar los valores de pM en disolución, es decir, estudiar que cantidad de Fe³⁺ o Cu²⁺ que queda libre en una disolución compuesta únicamente por el quelato del metal correspondiente.

En condiciones agronómicas (cultivos hidropónicos y suelo) se ha visto anteriormente que además del quelato férrico existen otro muchos factores que pueden afectar sobre la estabilidad del quelato. Cuando se estudia la estabilidad en condiciones hidropónicas el Fe³⁺ del quelato férrico compite con otros cationes esenciales en la nutrición de la planta. La competencia dependerá de la constante de estabilidad del metal competidor y de su concentración en el medio. Halvorson and Lindsay (1972) propusieron una composición de una disolución nutritiva (Hoagland) donde estaban presentes todos los elementos y en las concentraciones demandadas para una nutrición óptima. Posteriormente Lindsay and Ajwa (1994) utilizaron un modelo de especiación química (MINTEQA2, Allison et al. 1990), en el cual utilizando la composición de la disolución nutritiva de Hoagland, para estudiar la variación de la actividad de Fe³⁺ libre dependiendo de la concentración del metal en el medio. Así comprobaron que cuando la actividad de Fe³⁺ libre disminuía por debajo de $\text{LogFe}^{3+}_{\text{libre}} = 10^{-21}\text{M}$, es decir por encima de $\text{pFe}^{3+} = 21$,

se producían síntomas de deficiencia en los cultivos. Bell et al. (1991) demostraron como a través de la especiación teórica se puede controlar las actividades del metal para identificar los niveles críticos de nutrientes para las plantas, así vieron que una actividad de Cu^{2+} libre en disolución nutritiva inferior a $\text{LogCu}^{2+}_{\text{libre}} < 10^{-16}\text{M}$, es decir $\text{pCu}^{2+} > 16$, produce síntomas de deficiencia en cultivos de maíz. La concentración de metal libre óptima de penderá directamente del cultivo. La medida de las actividades del metal libre en disoluciones nutritivas a los niveles tolerados por las plantas es muy difícil o casi imposible (McGrath et al. 1986), pero es posible estimar estas actividades. El uso de programas de simulación como el GEOCHEM-PC (Parker et al., 1987; Sposito and Mattigod, 1980) y el MINTEQA2 (Allison et al. 1990) permite determinar las actividades del ion libre utilizando las disoluciones nutritivas a cualquier concentración del metal o del quelato que se desee. Por lo tanto la utilización del segundo modelo (modelo 2) para determinar los valores de pFe^{3+} y pCu^{2+} nos permite por un lado comparar la estabilidad de los diferentes quelatos y por otro lado conocer los niveles de Fe^{3+} y Cu^{2+} libres como índices de aporte de estos nutrientes a las plantas.

Los valores de pFe^{3+} y pCu^{2+} son mayores para el modelo 1 que para el modelo 2 en todos los agentes quelantes estudiados. En el modelo 1 no existe competencia alguna entre el quelato férrico y otro metal; esto produce que la estabilidad sea mayor y por lo tanto los valores de pM sean mayores. Además y debido a la competencia que existe entre los cationes, en el segundo modelo las diferencias entre los valores de los agentes quelantes se reducen para pFe^{3+} y pCu^{2+} . Debio a la falta de competencia entre cationes en el primer modelo la estabilidad de los agentes quelantes es similar a sus constantes de estabilidad con Fe^{3+} y Cu^{2+} . La excepción viene dada por el EDDHSA el cual presenta una constante de constante de estabilidad con Fe^{3+} sensiblemente más baja y, en cambio aparece con los valores más altos de pFe^{3+} . Estos valores son contradictorios con los presentados por Motekaitis et al. (1990) cuando comparaba los pFe^{3+} del HBED y de SHBED a pH 7.4 (29.8 y 27.7 respectivamente). La mayor acidez del EDDHSA hace que sea más estable a pHs ácidos, en cambio las constantes de protonación del SHBED no son tan ácidas. Para el caso del *o,p*-EDDHA presenta valores de pFe^{3+} significativamente menores que el *o,o*-EDDHA de acuerdo con sus constantes de estabilidad de Fe^{3+} . En cuanto a la isomería, el *rac*-EDDHA y el *meso*-EDDH4MA siguen siendo los que presentan unos valores más altos de pFe^{3+} y pCu^{2+} . Bannochie et al. (1989) obtuvo resultados

similares para los isómeros del EDDHA siendo el *rac*-EDDHA el más estable (mayor valor de pFe^{3+}).

La incorporación de los quelatos férricos a una disolución nutritiva con otros cationes presentes producen diferentes comportamientos a los descritos en el modelo 1. De forma general se puede decir que todos ellos presentan unos valores de pFe^{3+} similares aunque cabe destacar que el *p*-XDDHA presenta unos valores de pFe^{3+} ligeramente superiores al EDDHA entre un intervalo de pH de 6-9, aunque a pHs inferiores y superiores baja sensiblemente su estabilidad. Esto es debido a que este agente quelante tiene muy poca afinidad por el Cu^{2+} (recordemos que a pH menores que 8 el quelato *p*-XDDHA/ Cu^{2+} se rompe) por lo tanto no existe competencia y es más eficaz quelando Fe^{3+} que el propio EDDHA. Este resultado hay que tomarlo con precaución ya que estudios espectrofotométricos previos demuestran que a pHs ácidos la estabilidad de este quelato férrico disminuye considerablemente ya que es a pHs superiores a 8 cuando el quelato presenta una estabilidad fotométrica, a pHs inferiores a 6 el quelato férrico se descompone cuando pasan unos días. El otro resultado relevante es el aumento del pFe^{3+} del *o,p*-EDDHA hasta niveles similares al *o,o*-EDDHA indicando que no existen diferencias significativas entre ambos agentes quelantes a la hora de aportar Fe^{3+} libre a la disolución.

Si se comparan los valores de pFe^{3+} ($pFe^{3+} = 21$) y pCu^{2+} ($pCu^{2+} = 16$) propuestos por Lindsay and Ajwa (1994) y Bell et al. (1991) respectivamente como valores límites por debajo de los cuales se induce la deficiencia del metal, con los valores obtenidos por el segundo método se puede decir que todos los agentes quelantes presentan valores inferiores a estos para Fe^{3+} y Cu^{2+} hasta un pH de 9 a partir de este pH la concentración de Fe^{3+} y Cu^{2+} libre en el medio no sería suficiente para nutrir a los cultivos (Apéndice 4). Esto indica que a una concentración de $10^{-4}M$ del quelato férrico en una disolución nutritiva se deja el suficiente Fe^{3+} libre en el medio para que lo tome la planta sin presentar síntomas de deficiencia. Actualmente Lucena et al. (2002) que en plantas que desarrollan la Estrategia II el pFe no es importante ya que la planta es capaz de reconocer el quelato férrico y desplazar el Fe^{3+} del quelato hacia la raíz de la planta para se absorbido. Por lo tanto el pFe^{3+} sólo es un índice cinético con el cual se indica la mayor o menor estabilidad del quelato férrico para ceder el Fe^{3+} al medio o directamente a la planta. Mediante la Hierro-Quelato-Reductasa (FCR) las plantas dicotiledóneas aumentan

la capacidad reductora de la raíz la cual es capaz de reducir el Fe directamente de quelatos en los que esté incluido (Marschner and Römheld, 1995).

8.4. MODELIZACIÓN TEÓRICA DE LOS QUELATOS FÉRRICOS EN CONDICIONES AGRONÓMICAS

Los principios que gobiernan la estabilidad de los quelatos en los suelos están descritos profusamente por Lindsay (1979). Cuando se compara la efectividad para mantener el Fe^{3+} en forma quelada entre diferentes quelatos férricos, Lindsay and Ajwa (1994) observan que de los quelatos estudiados el EGTA tiene pérdidas significativas de Fe^{3+} quelado a pH de 5, EDTA a pHs superiores a 6 y DTPA y CDTA a pHs superiores a 7, en cambio el EDDHA es capaz de mantener el 100% del hierro en forma quelada en todo el intervalo de pH de los suelos (4-9). Resultados similares a estos se han obtenido en el presente trabajo para el EDTA y el EDDHA en las diferentes condiciones agronómicas.

Si se analiza la estabilidad de los quelatos atendiendo a su estructura molecular claramente se observa que la sustitución de un grupo funcional dentro del anillo de benceno (metilo o sulfonilo) en diferentes posiciones produce quelatos férricos capaces de mantener todo el Fe^{3+} en forma quelada en un amplio intervalo de pH incluyendo el característico de suelos. Incluso se observa un ligero aumento de la estabilidad cuando se comparan el EDDH4MA, EDDH5MA y EDDHSA con el EDDHA. Estos resultados están de acuerdo con su similar afinidad tanto por los H^+ como por los metales (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{3+}) (Bannochie and Martell, 1989; Ahrlund et al. 1990). Álvarez-Fernández (2000) llegó a la conclusión que el EDDHA y el EDDH4MA se comportaban de forma similar en cuanto a reactividad química. Por el contrario la reactividad del EDDHSA era mayor y su estabilidad menor. Cuando se observa el comportamiento del EDDHSA en el modelo de suelo se ve que su estabilidad es, incluso, mayor que la del EDDHA y EDDH4MA. Esta diferencia puede ser explicada por la utilización de patrones de alta pureza en nuestro trabajo mientras que Álvarez-Fernández (2000) utilizó muestras comerciales con que la presencia de impurezas que afectan sobre la estabilidad real del producto. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Cantera et al. (2002), estos autores observaron que el EDDHSA/ Fe^{3+} y el EDDCHA/ Fe^{3+} mostraban una mayor capacidad por mantener el Fe-quelado que el EDDHA/ Fe^{3+} y EDDH4MA/ Fe^{3+} en la disolución del suelo a lo largo del tiempo. Además estos autores manifestaron la falta de patrones de

referencia de EDDHSA y EDDCHA necesarios para poder cuantificar las muestras comerciales que contengan estos agentes quelantes.

A medida que aumenta la longitud de la cadena carbonada entre las aminas, el porcentaje de Fe-quelado disminuye, sobre todo a pHs ácidos. Como se explicó en el capítulo 7 este hecho es relevante sobre todo en fertirrigación comercial donde se producen cambios bruscos de pH (Bermúdez 1998, Bermúdez et al. 1999; Cadahía 2000). Así Lucena et al (1992a) observaron que cuando el pH variaba de 1 a 7.5 sólo se recomponía el 75% del EDDHA/ Fe^{3+} . Por lo tanto es fácilmente predecible que los quelatos férricos de PDDHA, BDDHA y *p*-XDDHA sufran procesos de descomposición si se utilizan en condiciones agronómicas. Lucena et al. (2002) postularon que la actividad de la FCR es tanto más efectiva cuanto menos estable es el quelato que se use como sustrato. Así cuando compararon el PDDHA/ Fe^{3+} con el EDDHA/ Fe^{3+} observaron que aquel producía menos Fe reducido aunque la concentración de Fe en savia era similar cuando se usaban ambos agentes quelantes como sustratos. El comportamiento de *p*-XDDHA en suelos es distinto al que presenta en disolución y condiciones hidropónicas ya que, aunque sigue mostrando cierta inestabilidad en pHs ácidos, presenta una estabilidad mayor en condiciones básica (véase capítulo 7)

Álvarez-Fernández (2000) enunció la presencia en la molécula *o,o*-EDDHA del grupo fenolato con el hidroxilo en posición *orto* respecto de la cadena de carácter aminocarboxílico, determina la elevada estabilidad del quelato férrico. Los resultados obtenidos cuando se analiza el comportamiento del *o,o*-EDDHA junto con el *o,p*-EDDHA, *p,p*-EDDHA y EDDMtxA confirmar este enunciado. Este hecho tiene gran importancia ya que, como demostrara Hernández-Apaolaza et al. (1997), cuanto mayor sea la proporción del isómero posicional *p,p*-EDDHA en las formulaciones comerciales de EDDHA sintetizadas mediante la ruta de Dexter (1958) mayor será la cantidad de Fe^{3+} no quelada y por lo tanto menor la eficacia de esa formulación como corrector de clorosis férrica.

El comportamiento del *o,p*-EDDHA en condiciones agronómicas es difícilmente predecible ya que, como se ha comprobado con sus constantes de estabilidad, su reactividad es grande y su comportamiento dependerá mucho de la composición del suelo y sobre todo de la concentración de Cu^{2+} en la disolución del suelo. Los resultados están de acuerdo con los obtenidos por Álvarez-Fernández (2000) cuando realizó un ensayo de

interacción con EDDHA/ Fe^{3+} en diferentes suelos con alto y bajo contenido en Cu^{2+} . En suelos con alto contenido en Cu^{2+} el *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} es desplazado por Cu^{2+} mientras que este desplazamiento no sucede en suelos con bajos contenidos de Cu^{2+} . Para una total caracterización del *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} es necesario realizar ensayos de interacción con diferentes materiales edáficos y sobre ensayos biológicos utilizando un patrón de alta pureza para tener un total conocimiento de su capacidad como corrector férrico.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

A partir del planteamiento, desarrollo y resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que:

1. **Se ha puesto a punto una metodología secuencial adecuada para caracterizar y posteriormente evaluar quelatos férricos - con estructuras similares a EDDHA/Fe³⁺.** La caracterización del agente quelante se consigue mediante la determinación de su riqueza y con el cálculo de las constantes de formación de las especies protonadas y de los quelatos metálicos (H⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺ y Fe³⁺). La estabilidad del quelato férrico se evalúa mediante el parámetro pM^m, así como con la modelización teórica en diferentes condiciones agronómicas. Las principales conclusiones alcanzadas con la metodología propuesta son:
 - 1.1. **Se ha planteado, desarrollado y puesto a punto un método fotométrico novedoso para determinar la riqueza de los agentes quelantes.** La alta estabilidad y la elevada absorción del quelato férrico formado a 480 nm (enlace Fe-fenolato) hacen que este método sea específico para cuantificar agentes quelantes fenólicos análogos al EDDHA. La ventaja de este método frente a los utilizados es que las impurezas orgánicas e inorgánicas ni interfieren ni se cuantifican y además no necesitan patrones de referencia para su cuantificación. La utilización de este método junto con los utilizados actualmente a tal respecto (¹H-RMN, ¹³C-RMN y HPLC) proporcionarán una información completa sobre la riqueza y pureza del agente quelante.
 - 1.2. **Se han puesto a punto dos métodos fotométricos para determinar las constantes de estabilidad de quelatos de Fe³⁺ y Cu²⁺ con agentes quelantes fenólicos.** Se han determinado las constantes de estabilidad de las especies FeL, FeHL, FeH₂L, FeOHL, a 480 nm y CuL, CuHL y CuH₂L a 650 nm. El uso de un espectrómetro unido a los valoradores automáticos permiten relacionar el cambio de color a un pH determinado de forma exacta y precisa. Las constantes de estabilidad se determinan minimizando la diferencia cuadrática entre la absorbancia teórica (calculada por balance de masas) y la absorbancia

experimental (en todo el intervalo de pH) variando las constantes y las absorptividades introducidas como semilla.

- 1.3. pFe^{3+} es disolución acuosa y nutritiva es un índice adecuado para comparar la afinidad de los agentes quelantes con Fe ya que incluye el efecto de las condiciones del medio.
- 1.4. La modelización teórica en condiciones agronómicas (solución, hidroponía y suelo) permiten predecir la distribución de las especies y la estabilidad frente al pH de los quelatos férricos en el equilibrio.
2. Los ligandos sintetizados según el método de Sierra et al. (2002) (EDDHA, EDDH4MA, EDDH5MA, PDDHA, BDDHA, *p*-XDDHA) y los facilitados por DABEER (EDDHSA) y Syngenta Crop Protection (*o,p*-EDDHA) poseen una gran pureza lo que indica que se pueden utilizar como patrones de referencia para cuantificar productos comerciales que contengan el mismo agente quelante o para desarrollar nuevos métodos analíticos que permita la identificación y cuantificación de estos nuevos agentes quelantes.
3. La capacidad de EDDH4MA, EDDH5MA y EDDHSA para mantener el Fe quelado en condiciones agronómicas son similares e incluso ligeramente superiores que para el EDDHA aunque las constantes de estabilidad del con Mg^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{3+} sean ligeramente menores que para el EDDHA. La sustitución del grupo metilo en posición 5 (EDDH5MA) dentro del anillo de benceno afecta más negativamente sobre la estabilidad que la sustitución en la posición 4 (EDDH4MA). La mayor acidez del EDDHSA afecta sobre su comportamiento ácido-base y sobre sus constantes de formación pero no sobre la estabilidad del quelato férrico en disolución, cultivos hidropónicos y suelo.

4. A medida que aumenta la cadena hidrocarbonada que une los grupos aminos (PDDHA y BDDHA) disminuyen significativamente las constantes de estabilidad de Cu^{2+} y Fe^{3+} y la capacidad por mantener el Fe quelado en condiciones agronómicas con respecto al EDDHA. Sin embargo la presencia de un grupo *p*-xilileno entre los grupos aminos reduce la basicidad del *p*-XDDHA hasta niveles similares a los del EDDHA, esto produce un aumento de la selectividad por metales tales como el Fe^{3+} frente al Cu^{2+} aumentando la capacidad por mantener el Fe-quelado a pHs básicos.
5. Los isómeros *rac*-EDDHA y *meso*-EDDH4MA presentan una mayor afinidad por Mg^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{3+} que el *meso*-EDDHA y *rac*-EDDHA. Sin embargo todos ellos son capaces de mantener todo el Fe en forma quelada a pHs de suelos.
6. La sustitución del grupo hidroxilo en posición *orto* respecto a la cadena carbonada por grupos funcionales no disociables (EDDMtxA) o el desplazamiento a la posición *para* de los dos grupos hidroxilos (*p,p*-EDDHA) produce agentes quelantes incapaces de complejar Fe^{3+} .
7. Debido a la presencia en posición *para* de un grupo fenol en *o,p*-EDDHA, la afinidad por Fe^{3+} de este agente quelante es inferior a la del *o,o*-EDDHA. Sin embargo es capaz de mantener el Fe en forma quelada a pHs agronómicos en disolución y en condiciones agronómicas. La presencia de Cu^{2+} en suelos en concentraciones elevadas puede llegar a sustituir el Fe^{3+} del *o,p*-EDDHA/ Fe^{3+} .



CAPÍTULO 10

BIBLIOGRAFÍA

Ahrland, S.; Dahlgren, A.; Persson, I. (1990) Stabilities and hydrolysis of some iron (III) and manganese (III) complexes with chelating ligands. *Acta Agric. Scand.*, **40**, 101-111.

Alcántara, E.; F. J. Romera, M. Cañete y M. D. de la Guardia. (1994). Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe(II) reductase in Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. *J. Experimental Botany* **45**(281):893-1898.

Alhendawi, R.A.; V. Römheld, E.A. Kirby y H. Marschner. (1997). Influence of increasing bicarbonate concentrations on plant growth, organic acid accumulation in roots and iron uptake by barley, sorghum and maize. *J. Plant Nutr.* **20**, 1731-1753.

Allison, J. D.; Brown D. S.; Novo-Gradak K. J. *MINTEQA2/PRODEFA2. A Geochemical Assessment Model for Environmental Systems. Version 3.0. User's Manual.* Washington D. C., Environmental Research Laboratory. United States Environmental Protection Agency. 1990.

Álvarez-Fernández, A. (1995). Interacción de quelatos férricos con componentes del suelo. Aplicación en cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Memoria de licenciatura. Universidad Autónoma de Madrid.

Álvarez-Fernández, A. (2000) Calidad y eficacia de quelatos férricos (FeEDDHA, FeEDDHMA, FeEDDHSA y FeEDDCHA) como fertilizantes. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

Álvarez-Fernández, A.; García-Marco, S.; Gómez-Gallego, M.; Sierra, M.A. y Lucena, J.J. (2001). Commercial iron chelate fertilizers. European market. Libro de resúmenes del 12th World Fertilizer Congress. Beijing (China).

Álvarez-Fernández, A. (2000). Quality of European Commercial iron chelates. The case of Spain. Libro de resúmenes del 10th International Symposium of Iron Nutrition and Interactions in Plants. Houston (EE.UU.).

Álvarez-Fernández, A.; Cremonini, M. A.; Sierra MA; Placucci, G y Lucena, J.J. (2002). The nature of Impurities in Fertilizers Containing EDDHMA/ Fe^{3+} , EDDHSA/ Fe^{3+} and EDDHCA/ Fe^{3+} chelates. J. Agric. Food Chem., **50**, 284-290.

Álvarez-Fernández, A.; A. Gárate; M. Juárez y J.J. Lucena. (1996). Tomato acquisition of iron chelates in a calcareous sandy substrate. J. Plant Nutr. 19(8&9):1279-1293.

Álvarez-Fernández, A.; A. Gárate y J. J. Lucena. (1997). Interaction of iron chelates with several soil materials and with a soil standard. J. Plant Nutr. 20(4&5):559-572.

Álvarez-Fernández, A.; García-Marco, S.; Lucena, J.J. (2003). Efficacy of synthetic iron chelates (EDDHA/ Fe^{3+} , EDDHMA/ Fe^{3+} and EDDHSA/ Fe^{3+}) to control iron chlorosis. Europ. J. Agron, (en revisión).

Anderegg, G.; L'Eplattenier, F. (1967) Metallindikatoren VII. Die Aciditätskonstanten und der Eisenkomplex des N,N'-Áthylen-bis-(o-hydroxyphenyl-glycins (=EHPG). Helv. Chim. Acta., **47** (4), 1067-1075.

ASTM. Standard Specification for Reagent Water. (1995). Annual Book of ASTM Standards, 11.01.

Bailey, N. A.; D. Cummins, E. D. McKenzie y J. M. Worthington. (1981). Iron (III) compounds of phenolic ligands. The crystal and molecular structure of iron (III) compounds of the sexadentate ligand N,N'-ethylene-bis-(o-hydroxyphenylglycine). Inorg. Chem. Acta **50**, 111-120.

Bannochie C.J.; Martell A. (1989) Affinities of racemic and meso forms of N,N'-ethylenebis [2-(o-hydroxyphenyl)glycine] for Divalent and Trivalent Metal Ions. J. Am. Chem. Soc. 1989, **111**, 4735-4742.

Bannochie, C.J.; Martell, A.E. (1991). Synthesis, separation, and equilibrium characterization of racemic and meso forms of a new multidentate ligand: N,N'-

- Trimethylenebis[2-(2-hydroxy-3,5-dimethylphenyl)glycine], TMPHPG. *Inorg. Chem.*, **30**, 1385.
- Barak, P. y Y. Chen.** (1987). Determination of Fe-EDDHA in Soils and Fertilizers by Anion Exchange Chromatography. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **51**, 893-896.
- Basolo, F.; Johnson, R.** (1964). Introduction to coordination chemistry. *Coordination Chemistry*; W.A. Benjamin Pubs., New York.
- Bell P. F.; Chaney R. L. and Angle J. S.** (1991). Determination of the copper activity required by maize using chelator buffered nutrient solutions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **55**, 136-1374.
- Bell P.F.; Chen, Y; Potts, W.; Chaney R.L.; Angle J.S.** (1991) A revaluation of the Fe(III), Ca(II), Zn(II), and proton formation constants of 4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolinedisulfonate. *Biological Trace Element Research.*, **30**, 125-144.
- Bermúdez, M. D.** (1998). Descomposición-formación de los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA en disolución nutritiva. (Estudio cinético y cromatográfico). Tesis Doctoral. Universidad de Alicante.
- Bermúdez, M. D.; M. Juárez, J. Jordá, J. Sánchez-Andreu y J.J. Lucena.** (1999). Kinetics of reactions of chelates FeEDDHA and FeEDDHMA as affected by pH and competing ions. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **30** (19&20), 2769-2784.
- Bernauer, K.** (1976). Diastereoisomerism and diastereoselectivity in metal complex. *Topics in Current Chemistry.* **6**, 1.
- Boxema, R.** (1979). Analysis of iron chelates in commercial iron fertilizers by gel chromatography. *Pflanzenernaehr. Bodenkd.* **142**, 824-835.
- Buchberger, W.; P. R. Haddad y P. W. Alexander.** (1991). Separation of metal complexes of ethylenediaminetetraacetic acid in environmental water samples by ion chromatography with U.V. and potentiometric detection. *J. Chromatogr.* **558**, 181-186.

Bucheli-Witschel, M.; Egli, T. (2001). Environmental fate and microbial degradation of aminopolycarboxylic acids. *FEMS Microbiology Reviews*, **25**, 69.

Cadahía, C.; A. Gárate, A., J. J. Lucena. (1987). Oligoelementos en fertirrigación. Actas I Simposio Nacional de Fertilización en Riego Localizado. Almería. pp. 221-230.

Cadahía López, C. (2000). Fertirrigación. Cultivos hortícolas y ornamentales. Ediciones Mundi-Prensa (2ª Edición)

Cantera R. G.; Zamarreño, A. M. And García-Mina J. M. (2002) Characterization of comercial iron chelates and their behavior in an alkaline and calcareous soil. *J. Agr. Food Chem.*, **50**(26), 7609-7615.

Carpena, O. 1957. La clorosis férrica del limonero I. *Anal. Edaf.* **16**:259-272.

CEN. EN 13368-2001:2 E. (2001a). Determination of chelating agents in fertilizers by Ion Chromatography Part 1: EDTA, HEDTA and DTPA.

CEN. EN 13368-2001:2 E. (2001b). Determination of chelating agents in fertilizers by Ion Chromatography Part 2: EDDHA and EDDHMA.

CEN. EN 13366:2001 E. (2001c). Treatment with a cation exchange resin for the determination of chelated micronutrient content and of the chelated fraction of micronutrient.

Cianzio, S. R. (1995). Strategies for the genetic improvement of Fe efficiency in plants. pp.: 119-126. En: Iron Nutrition in Soils and Plants. (Ed.) J. Abadía. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.

Chaney, R. L. (1984). Diagnostic practises to identify iron deficiency in higher plants. *J. Plant. Nutr.*, **7**, 47-67.

- Chen, Y.** 1997. Remedy of iron deficiency - present and future. pp.: 111. *En: Abstracts 9th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants*. Hohenheim, Stuttgart, Germany.
- Chen, Y. y P. Barak.** (1982). Iron nutrition of plants in calcareous soils. *Adv. Agron.* **35**, 217-240.
- Clark N. H. y Martell A. E.** (1988). Ferrous chelates of EDTA, HEDTA and SHBED. *Inorg. Chem.*, **27**, 1297-1298.
- Cremonini, M. A.; Alvarez-Fernandez, A; Lucena, J.J.; Rombola, A; Marangoni, B; Placucci, G.** (2001). NMR Analysis of the Iron Ligand Ethylenediaminedi(o-hydroxyphenyl) acetic Acid (EDDHA) Employed in Fertilizers. *J. Agric. Food Chem.*, **49** (8), 3527-3532.
- Cremonini, M. A.; Placucci, G.; Rombolá, A. y Marangoni, B.** (2000). Analysis of synthetic EDDHA/Iron chelates by NMR spectroscopy. Libro de resúmenes del 10th International Symposium of Iron Nutrition and Interactions in Plants. Houston (EE.UU.).
- Dawson, J. M. y V. B. Warne.** (1992). Iron chelate compositions. U.S.A. Patent N° 5,152,820.
- Deacon, M.; Smyth, M. R.; Tuinstra, L. G. M.** (1994). Chromatographic separations of metal chelates present in commercial fertilizers. II. Development of an ion-pair chromatographic separation for the simultaneous determination of the Fe(III) chelates of EDTA, DTPA, HEEDTA, EDDHA and EDDHMA and the Cu(II) Zn(II) and Mn(II) chelates of EDTA. *J. Chromatogr. A.*, **659**, 349.
- Dexter, M.** (1958). Preparation of phenolic ethylenediaminepolycarboxylic acids. U.S.A. Patent N° 2,824,128.
- Foy, C.D.; M. P. W. Farina y A. J. Oakes.** (1998). Iron manganese interactions among clones of nilegrass. *J. Plant Nutr.* **21**, 987-1009.

Frost A. E. y H. H. Freedman. (1959). Addition of hydrogen cyanide to aromatic Schiff bases. *J. Org. Chem.* **24**, 1905-1907.

Frost A.E.; Freddman H.H.; Westerback S.J.; Martell A.E. (1958). Chelating tendencies of N,N'-Ethylenebis-[2-(o-hydroxyphenyl)]-glycine. *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 530-536.

Ganeshpure P. A.; Kar, D. y Satish, S. (1992). N,N'-bis(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-dipropionic acid. A new chelating ligand for Iron(III). *Transition Met. Chem.*, **17**, 212-215.

García-Marco, Sonia; Yunta, Felipe; Martín de la Hinojosa, M. Ignacia; Martí, Gabriel y Lucena, Juan J. (2003) Evaluation of commercial Fe(III)-Chelates using different methods. *J. Plant Nutrition* (En prensa).

Gómez-Gallego, M.; Sierra, M. A.; Alcázar, R.; Ramírez, P.; Piñar, C.; Mancheño, J.; García-Marco, S.; Yunta F.; Lucena, J. J. (2002). Synthesis of o,p-EDDHA and its detection as the main impurity in o,o-EDDHA commercial iron chelates. *J. Agric. Food. Chem.*, **50**, 6395.

Good, N. E.; Winget, D.; Winter, W.; Connolly, T. N. (1966). Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. *Biochemistry*, **5**(2), 467-477.

Gorrindo, P. J.; E. Dominguez, M. Diaz, J. Oriol y R. Piñol. (1994). Procedimiento de preparación de nuevos quelatos y sales complejas de hierro con otros metales de transición, y su aplicación para combatir carencias de oligoelementos en los vegetales. ES Patente Nº 2 036 490.

Gran, G. (1952). Determination of the Equivalence Point in Potentiometric Titration. Part II. *Analyst*, **77**, 661.

Halvorson, A.D.; Lindsay, W.L. (1972). Equilibrium relationships of metal chelates in hydroponic solutions. *Soil. Sci. Soc. Am. Proc.*, **36**, 755-761.

Hancock, R. D., Martell, A. E. (1988). The chelate, cryptate and macrocyclic effects. *Comments Inorg. Chem*, **6**, 237.

Hancock, R. D. (1986). Macrocycles and their selectivity for metal ions on the basis of size. *Pure Appl. Chem*, **58**, 1445-52.

Hancock, R. D.; Martell, A. E. (1989). Ligand design for selective complexation of metal ions in aqueous solution. *Chem. Rev.*, **89**, 1875-1914.

Hernández-Apaolaza, L.; Álvarez-Fernández, A. y Lucena, J.J. (2000). Chromatographic Determination of Commercial Fe(III) Chelates. *J. Plant Nutrition.*, **23** (11 & 12), 2035-2045.

Hernández-Apaolaza, L.; Barak, P.; Lucena J.J. (1997) Chromatographic determination of commercial Fe(III) chelates of ethylene diaminetetraacetic acid, ethylene diaminedi(o-hydroxyphenylacetic) acid and ethylenediaminedi(o-hydroxy-p-methylphenylacetic) acid. *J. Chromatogr. A.*, **789**, 453-460.

Hernández-Apaolaza, L and Lucena J.J. (2001) Fe(III)-EDDHA and -EDDHMA sorption on Ca-Montmorillonite, Ferrihydrite, and Peat. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5258-5264.

Hider, R. C. (2000). Physical chemistry of synthetic iron chelates. Libro de resúmenes del 10th International Symposium of Iron Nutrition and Interactions in Plants. Houston (EE.UU.).

Hill-Cottingham, D. G. (1957). Spectrophotometric determination of iron chelates II. *Analyst*, **82**, 524.

Hill-Cottingham, D.G. (1962). The paper chromatography of some complexones and their iron chelates. *J. Chromatogr.* **8**, 261-264.

Hjelte, V. y S. Aminke. (1989). The relative stability of Fe-EDDHMA and Fe-EDDHA in a pH range of 4 to 9. Comm. 5th Inter. Symp. Iron Nutr. Interac. Plants. Ramat-Rachel. Israel.

Hoefnagel, A. J. y H. van Bekkum. (1994). Process for separating the ortho- and para- isomers of hydroxymandelic acid or a salt thereof, the isomers thus obtained, the use of the *ortho*-isomer for the preparation of EDDHA. International Patent Classification: C07C 59/52, 51/48, 51/487, C07B 57/00.

Jaffe, H. H. y M. Orchin. (1962). Theory and applications of ultraviolet spectroscopy. John Wiley and sons, Inc. N.Y

Juárez Sanz, M.: Sánchez-Andreu, J. (1996). Fósforo en Agricultura. Secretariado de Plublicaciones de la Universidad de Alicante.

Julien, J. A. L.: Aymand, A. Nouveau procede de preparation de l'acide etylenediamine N,N'-bis(o-hydroxyphénylacétique) et de derives de celui-ci. European Patent 0,331,556 A2.

Knell, M.: Kroll, H. (1960) Iron chelates of ethylene bis(alpha-imino-ortho-hydroxyphenylacetic acid) and method of overcoming deficiencies in growing plants therewith. U.S. Patent 2,921,847.

Knell M. y H. Kroll. 1961. Ethylenediamine derivates containing aromatic rings. U.S.A. Patent N° 3,005,848.

Köseoglu, A. T. (1995). Investigation of relationships between iron status of peach leaves and soil properties. J. Plant Nutr. 18(9):1845-1859.

Kroll, H.: M. Kell, J. Powers y J. Simonian. (1957). A phenolic analog of ethylenediaminetetraacetic acid. J. Am. Chem. Soc. 79:2024-2025.

Lahav, N. y M. Hochberg. (1975). Kinetics of fixation of iron and zinc applied as FeEDTA, FeEDDHA and ZnEDTA in the Soil. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 39, 55-58.

Lehman, D. (1963). Some principles of chelation chemistry. pp. 167-170. En: Proc. Symp. Chelates in Soils. Soil Sci. Soc.

L'Eplattenier, F.; Murase, I.; Martell A. (1967). New multidentate ligands. VI. Chelating tendencies of N,N'-Di(2.-hydroxybenzyl) ethylenediamine-N,N'-diacetic Acid. *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 837.

Lin, W.; W. I. Welsh y W. R. Harris. (1994). Molecular mechanics studies of model iron (III) transferrin complexes in vacuo and in aqueous solution. *Inorg. Chem.* **33**, 884-890.

Lindsay, W. L. 1979. *Chemical Equilibria in Soils*. Ed. John Wiley and sons. N.Y., USA

Lindsay, W. L. (1984). Soil and plant relationships associated with iron deficiency with emphasis on nutrient interactions. *J. Plant Nutr.* **7**, 489-500.

Lindsay W. L. and Ajwa H. A. (1994). Use of MINTEQA2 for teaching soil chemistry. En: *Chemical Equilibrium Reactions Models*. Eds. R. H. Loeppert, S. Goldberg and A. P. Schwab. Soil Science Society of America, Madison, W.I.

Liñán, C. (2003). Correctores de carencias de hierro. pp.: 534-550. En: *Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales*. Agrotécnicas, S.L., Madrid, España. I.S.B.N.:84-87480-25-X (19ª Edición).

Liu, Z. D. y Hider, R. C. (2002a) Iron chelator chemistry, *En Molecular and cellular iron Transport*, p321-357, capítulo 13. D.M. Templeton, Marcel Decaer Inc. Eds.

Liu, Z. D. y Hider, R. C. (2002b). Design of iron chelators with therapeutic application. *Coord. Chem. Review*, **232**, 151-171.

Loeppert, R. H.; Wei, L. C.; Ocumpaugh, R. (1994). Soil factors influencing the mobilization of iron in clacaruous soils. Pp 343-360 In *Biochemistry of metal*

micronutrients in the rizhosphere. J. A. Manthey, D. E. Crowley, D. G. Luster (Eds). Lewis Publishers. Florida

Lucena, J. J. (1990). La clorosis férrica. *Agrícola Vergel.*, **4**, 296-301.

Lucena J.J. (2000). Effects of bicarbonate, Nitrate and other environmental factors on Iron deficiency clorosis. A review. *Journal of Plant Nutr.*, **23**(11 y 12), 1591-1606.

Lucena, J.J. (2002). Diagnosis of Fe status and use Fe chelates and complexes for the remediation of Fe clorosis. Book of Abstracts of XI International Symposium of Iron Nutrition and Interactions in Plants.

Lucena, J.J. (2003). Fe chelates for remediation of Fe chlorosis in strategy I plants. *Journal of Plant Nutrition* (en prensa)

Lucena, J.J., Albadalejo, R.; Green, C. and Chaney, R. L. (2002). Absorción de Fe por las plantas de pepino verdes estresadas a partir de diferentes quelatos férricos. Libro de comunicaciones del IX Simposio Ibérico sobre Nutrición Mineral de las Plantas. ISBN: 84-7820-657-4. Zaragoza (España).

Lucena, J. J.; Barak P.; Hernández-Apaolaza L. (1996) Isocratic ion-pair high-performance liquid chromatographic method for the determination of various iron (III) chelates. *J. Chromatogr. A*, **727**, 253-264.

Lucena, J. J.; A. Gárate y O. Carpena. (1987). Effect of carbon dioxide on the stability of iron-chelates. *J. Plant Nutr.* **10**, 553-565.

Lucena, J.J.; M. A. Jiménez de Aberasturi, A. Gárate. (1991). Stability of chelates in nutrient solutions for drip irrigation. pp. 63-67. En: Y. Chen y Y. Hadar (eds) *Iron Nutrition and Interactions in Plants*. Ed. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.

Lucena, J. J., M. Manzanares y A. Gárate. (1992). A test to evaluate the efficacy of commercial Fe-Chelates. *J. Plant Nutr.* **15**, 1553-1566.

Ma, R.; Martell, A. E. (1993). Protonation constants and metal ion binding constants of N,N'-bis(2-hydroxyphenyl)-N,N'-ethylenediaminediacetic acid. *Inorg. Chim. Acta*, **209**, 71-78.

Ma, R.; Murase I.; Martell, A. E. (1994a). Synthesis and characterization of metal complexes with N,N'-bis(2-hydroxybenzyl)-diethylenetriamine-N,N',N'-triacetic acid and the stabilities of its complexes with divalent and trivalent metal ions. *Inorg. Chim. Acta*, **223**, 109-119.

Ma, R.; Motekaitis, R. J.; Martell, A. E. (1994b). Stability of metal ion complexes of N,N'-bis(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-diacetic acid. *Inorg. Chim. Acta*, **224**, 151-155.

Ma R.; Motekaitis, R. J, Martell, A. E. (1994c). Synthesis of N-hydroxybenzyl-ethylenediamine-N,N',N'-triacetic acid and the stabilities of its complexes with divalent and trivalent metal ions). *Inorg. Chim. Acta.*, **233**, 137-143.

McGrath S. P.; Sanders J. R.; Laurie S. H. and Tancock N. P. (1986). Experimental determinations and computer predictions of trace metals ion concentrations in dilute complex solutions. *Analyst*, **111**, 459-465.

MacMillan, D. T.; Murase, I. y Martell, A. E. (1975). New multidentate ligands. XIV. Aqueous coordination chemistry of N,N'-bis(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-bis(methylenephosphonic) acid. *Inorg. Chem.* **14**(3), 468-473.

Maleki, N.; Haghighi, B.; Safavi, A. (1999). Evaluation of formation constants, molar absorptivities of metal complexes, and protonation constants of acids by nonlinear curve fitting using Microsoft Excel Solver and user-defined function. *Microchem. J.*, **62**, 229-236.

Marschner, H.; Römheld, V. (1995). Strategies of plants for acquisition of iron. Pp: 375-378. *En: Iron Nutrition in Soils and Plants.* (Ed) J. Abadía. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.

Martell, A. E.; Motekaitis, R. J. (1992). *Determination and Use of Stability Constants*. VCH Pubs. New York.

Martell, A. E.; Motekaitis, R. J.; Welch, M. J. y Pajean, T. (1999). New chelating agents suitable for the treatment of iron overload. *Inorg. Chim. Acta*, **391**, 238-246.

McCray, J. M. y J. E. Matocha. (1992). Effects of soil water levels on solution bicarbonate, chlorosis and growth of sorghum. *J. Plant Nutr.* **15**(10):1877-1890.

McCreay, T. W.; R. H. Maier y B. D. Knezek. (1964). The electrophoretic separation and detection of the isomers of ethylenediamine di-(*o*-hydroxyphenyl-acetic acid) metal chelates. *J. Chromatogr.* **14**(3), 544-549.

Mengel, K., Kirby, E.A., Kosegarten, H. and Appel. T. (2001). Iron. In *Principles of Plant Nutrition*. Kluwer Academic Pubs, Dordrecht, 553-571.

Miller, G.; Pushnik, J.; y Welkei G. (1984). Iron chlorosis, a world wide problem. The relation of chlorophyll biosynthesis to iron. *J. Plant. Nutr.*, **7**, 1-22.

Moog, P. R. y W. Brüggemann. (1994). Iron reductase system on the plant plasma membrane-A review. *Plant Soil* **165**, 241-260.

Moral, R.; I. Gómez, J. Navarro Pedreño y J. Mataix. (1994). Effects of cadmium on nutrient distribution, yield, and growth of tomato grown in soilless culture. *J. Plant Nutr.* **17**(6):953-962.

Morris, D. R.; R. H. Loeppert y T. J. Moore. (1990). Indigenous soil factors influencing iron chlorosis of soybean in calcareous soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **54**, 1329-1336.

Motekaitis, R.J.; Martell, A.E. (1982). BEST. A new program for rigorous calculation for equilibrium parameters of complex multicomponent systems. *Can. J. Chem.*, **60**, 2403.

Motekaitis R. J.; Martell, A. E. y Welch, M. J. (1990) Stabilities of Trivalent Metal complexes of phenolic ligands related to N,N'-bis(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-diacetic acid (HBED). *Inorg. Chem.*, **29**, 1463-1467.

Motekaitis, R. J.; Sun Y. y Martell, A. E. (1989). N,N'-Bispyridoxyethylendiamine-N,N'-diacetic acid (PLED) and N,N'-Bis(2-hydroxy-5-sulfobenzyletilenediamine-N,N'-diacetic acid (SHBED). *Inorg. Chim. Acta*, **159**, 29-39.

Motekaitis R. J.; Sun, Y; Martell, A. E.; Welch, M. (1991) Stabilities of Gallium(III), Iron(III) and Iridium(III) chelates of hydroxyaromatic Ligands with different overall charges. *Inorg. Chem.*, **30**, 2737-2740.

Norvell, W. A. (1991). Reactions of metal chelates in soils and nutrient solutions. pp.:187-227. En: Micronutrients in Agriculture. Ed. Mortvedt, Cox, Shuman y Welch. SSSA Book Series n° 4. Madison, WI (USA).

Nabhan, H. M.; vanderdeleen, J.; Cottenie, A. (1977) Chelate behavior in salin-añkaline soil conditions. *Plnat Soil*. **46**, 603.

O'nan, A.; L. L. Barton y G. V. Johnson. (1997). Inhibition of ferric-chelate reductase in alfalfa roots by cobalt. pp.: 82. En: Abstracts 9th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants. Hohenheim, Stuttgart, Germany.

Orphanos, P y C. Hadjiloucas. (1984). Laboratory test for screening iron chelates for use in alkaline soils. *Plant Soil* **77**, 401-404.

Parker D. R., Zelazny L. W. and Kinraide T. B. (1987). Improvements to the program GEOCHEM. *Soil. Sci. Soc. Am. J.*, **51**, 488-491.

Parkes, D. G.; M. G. Caruso y J. E. Spradling. (1981). Determination of nitriloacetic acid in ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt by reversed- phase ion pair liquid chromatography. *Anal. Chem.* **53**, 2154-2156.

Patch, M.G.; K. S. Simolo, y C. J. Carrano. (1982). The cobalt (III), chromium (III), copper (II) and manganese (III) complexes of ethylenebis(o-hydroxyphenyl)glycine: Models for metallothioneins. *J. Inorg. Chem.* **21**, 2972-2977.

Pearson, R. G. (1963). Hard and soft acids and bases. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3533.

Pérez-Sanz, A. (1993). Movilización de Fe(III) de óxidos férricos por el agente quelante α -EDDHA y su utilización por *Helianthus annuus*. Memoria de licenciatura. Universidad Autónoma de Madrid.

Petree, H.E.; J. W. Stutts. (1975). Iron complexes of ethylene-bis-(α -2-hydroxyarylacetic acids. U.S.A. Patent N° 3,903,119.

Petree, H.E.; H. L. Myatt y A. M. Jelenovsky. (1978). Preparation of phenolic ethylenediaminepolycarboxylic acids. U.S.A. Patent N° 4,130,582.

Reed, D.; Lyons, C.; Eachern, G. Mc. (1988) Field evaluation of inorganic and chelated iron fertilizers as foliar sprays and soil application. *J. Plant Nutr.*, 1369-1378.

Riley, P. E.; Pecoraro, V. L.; Carrano, C. J.; Raymond, K. N. (1983). Siderophilin metal coordination. 3. Crystal structures of the cobalt(III), gallium(III) and copper(II) complexes of ethylenbis[(o-hydroxyphenyl)glycine]. *Inorg. Chem.*, **22**, 3096

Romera, F. J.; E. Alcántara y M. D. de la Guardia. (1992). Role of roots and shoots in the regulation of the Fe efficiency responses in sunflower and cucumber. *Physiol. Plant.* **85**:141-146.

Ryskiewich, D.P. y G. Boka. (1962). Separation and characterization of the stereoisomers of N,N'-ethylenebis-[2-(o-hydroxy-phenyl)]-glycine. *Nature*, **193**, 472-473.

Sánchez-Sánchez, A. (2002). Mejora en la eficacia de los quelatos de hierro sintéticos a través de sustancias húmicas y aminoácidos. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante

Sanz, M.; Cervero, J. y Abadía, J. (1992). Iron chlorosis in the Ebro river basis, Spain. *J. Plant Nutr.*, **15**(10), 1971-1981.

Savitzky, A.; Golay, M. J. E. (1964) Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical Chem.*, **36**, 1627.

Sawada, T. and Kato, S. (1970). Dissociation constants of p-phenosulfonic acid, and determination of p-phenolsulfonic acid, sulfuric acid, and aluminium in integral color anodising bath consisting of p-phenolsulfonic and sulfuric acids. *Sumitomo Keidinxoku Giho*, **11**(1), 49-60.

Serratice, G.; Galey J-B, Aman, E. S. y Dumants, J. (2001). Iron (III) complexation by new aminocarboxylate chelators - Thermodynamic and kinetic Studies. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 471-479

Sierra, M.A.; Gómez-Gallego, M; Alcázar, R; Lucena, J.J.; Álvarez, A; Yunta-Mezquita F. (2002). Novel method for preparing bis(2hydroxyaryl)aminoacetic acids using cyanide transfer agents. Patente WO 02/00604.

da Silva, J.J.R.F. and Simoes, M.L. (1968). Studies on uranyl complexes. III. Uranyl complexes of EDTA. *Talanta*, **15**, 609-622.

Schmidt, W.; M. Bartels, J. Tittel y C. Fühner. (1997). Physiological effects of copper on iron acquisition processes in *Plantago*. *New Phytol.* **135**, 659-666.

Shenker, M.; I. Oliver, M. Helmann, Y. Hadar y Y. Chen. (1992). Utilization by tomatoes of iron mediated by a siderophore produced by *Rhizopus Arrhizus*. *J. Plant Nutr.* **15**, 2173-2182.

Sigman, M. S.; Vachal, P.; Jacobsen, E. N. (2000) A general catalyst for the asymmetric Strecker reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 1279.

Simon, L.; T. J. Smalley, J. Benton Jones, J. R. Lasseigne y F. T. Lasseigne. (1994). Aluminum toxicity in tomato. Part 1. Growth and mineral nutrition. *J. Plant Nutr.* 17(2&3):293-306.

Sposito G. and Mattigod S. V. (1980). *GEOCHEM: A computer program for the calculation of chemical equilibria in soil solutions and other natural water systems*. Kearney foundation of Soil Science, University of California, Riverside. pp 92.

Taliaferro C. H. y Martell, A. E. (1984). New multidentate ligands. XXVI. N,N'-bis(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-bis(methylenephosphonic acid monomethyl ester), and N,N'-bis(2-hydroxy-benzyl)ethylenediamine-N,N'-bis(methylenephosphonic acid monoethyl ester): New chelating ligands for trivalent metal ions. *J. Coord. Chem.*, 13, 249-264.

Terry, N. y A. M. Zayed. (1995). Physiology and biochemistry of leaves under iron deficiency. pp. 283-294 En: J. Abadía, Ed. *Iron Nutrition in Soils and Plants*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.

Thom, V.J.; Hosken, G. D.; Hancock, R. D. (1985). Anomalous metal ion size selectivity of tetraaza macrocycles. *Inorg. Chem.* 24, 3378-81.

Tong, Y. A.; F. Fan, R. F. Korcak, R. L. Chaney y M. Faust. (1986). Effect of micronutrients, phosphorus and chelator to iron ratio on growth, chlorosis and nutrition of apple seedlings. *J. Plant Nutr.* 9(1):23-41.

Underwood, A. L. (1958). Spectrophotometric Determination of Iron with Ehtylendiamine Di(o-Hydroxyphenylacetic acid). *Anal. Chemistry*, 30(1), 44-47.

Udoh, D.J.y L. E. Nelson. (1983). Triflualin-induced Fe chlorosis in soybeans (*Glycine Max* (L.) Mrr.) grown on calcareous soils of blackland prairie. *Agron. Abstr.*, 181.

Vachal, P.; Jacobsen, E. N. (2000) Enantioselective catalytic additions of HCN to ketoimines. Catalytic synthesis of quaternary amino acids. *Org. Lett.*, 2(6), 867-870.

Vande Gucht, I. (1994). Determination of chelating agents in fertilizers by ion chromatogr. J. Chromatography A, **671**, 359-365.

Venezky, D.L. y W. L. Rudzinsky. (1984). Determination of ethylenediaminetetraacetic acid in boiler water by liquid chromatography. Anal. Chem. **56**, 315-317.

Wallace, A. (ed). (1956) Symposium on the use of metal chelates in plant nutrition. Western Soc. Soil Sci. Sym., Seattle, W.A. National Press, Palo Alto, USA.

Wallace, A. (1971) Regulation of the micronutrient status of plants by chelating agents and other factors. A. Wallace, Ed. Los Angeles. USA.

Weil, R. R.; C. D. Foy y C. A. Coradetti. (1997). Influence of soil moisture regimes on subsequent manganese toxicity in two cotton genotypes. Agron. J. **89**, 1-8.

White, D. H. (1988). Complex for enhancing magnetic resonance imaging. Patente de EE.UU. 4.730.066.

Willard, H.H., Merritt, Jr. L. L., Dean J.A., Settle, Jr. F. A. (1988). Instrumental Methods of analysis. Wadsworth, Inc. Belmont, CA, USA.

Yamaguchi, A.; A. R. Rajput, K. Ohzeki y T. Kambara. (1983). Determination of ethylenediaminetetraacetic acid and nitrilotriacetic acid as their iron(III)-complexes by reverse phase high performance liquid chromatography. Bulletin Chemical Society of Japan, **56**, 2621-2623.

Yang, X; V. Römheld y H. Marschner. (1994). Effect of bicarbonate on root growth and accumulation of organic acids in Zn-inefficient and Zn-efficient rice cultivars *Oryza sativa* L. Plant Soil. **164**, 1-7.

Yunta, F.; García-Marco, S.; Lucena, J. J.; Gómez-Gallego, M.; Alcázar, R.; Sierra, M. A. (2003). Chelating agents related to ethylenediamino-di(orthohydroxyphenyl)acetic acid (EDDHA): Synthesis, characterization and equilibrium

10. Bibliografía

studies of the free ligands and their Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+} chelates. *Inorg. Chem.*,
(aceptado)

CAPÍTULO 11

ANEXOS

11. ANEXOS

ANEXO A. FUNDAMENTO TEÓRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ESTABILIDAD Fe^{3+} -LIGANDO POR UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO Y POTENCIOMÉTRICO SIMULTANEO.	241
ANEXO B. FUNDAMENTO TEÓRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ESTABILIDAD Cu^{2+} -LIGANDO USANDO UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO Y POTENCIOMÉTRICO SIMULTANEO.	247
APÉNDICE 1. PLANTILLAS DE HOJAS DE CÁLCULO PARA DETERMINAR (formato electrónico): Constantes de protonación de los fenolatos (ej. o,o-EDDHA) Constantes de estabilidad de Fe^{3+} (ej. o,o-EDDHA) Constantes de estabilidad de Cu^{2+} (ej. o,o-EDDHA)	CD
APÉNDICE 2. MINTEQA2 (formato electrónico): Bases de datos "Thermo.dbs" y "Comp.dbs" modificadas Archivo de entrada ".in" y de salida ".out" para los modelos de	CD

Disolución(ej. o,o-EDDHA)
Hidroponía(ej. o,o-EDDHA)
Suelo(ej. o,o-EDDHA)

APÉNDICE 3. Distribución teórica de las especies y componentes
(formato electrónico)

CD

APÉNDICE 4. Comparación de los pFe^{3+} y pCu^{2+} según la estructura de la
molécula (formato electrónico)

CD

APÉNDICE 5. Programa BEST para determinar mediante métodos
potenciométricos (formato electrónico):
Constes de protonación(ej. o,o-EDDHA)
Constantes de estabilidad de Ca^{2+} (ej. o,o-EDDHA)
Constantes de estabilidad de Mg^{2+} (ej. o,o-EDDHA)

CD

ANEXO A

(FUNDAMENTO TEÓRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ESTABILIDAD Fe^{3+} -LIGANDO POR UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO)

A.1. ECUACIONES QUÍMICAS

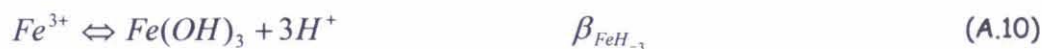
A.1.1. *Ligando*

Las constantes acumuladas de protonación se han calculado previamente utilizando métodos espectrofotométricos (para las constantes correspondientes a la disociación de los grupos fenólicos, L'Eplattenier et al. 1967)) y potenciométricos (grupos aminos y carboxílicos. Martell and Motekaitis, 1992)

A.1.2. *Fe-ligado*

Estas constantes son el objetivo de la metodología propuesta. Se usarán unas constantes teóricas basadas en la bibliografía, éstas serán utilizadas como semilla para, a través de sucesivas iteraciones, refinar y conseguir los valores finales.

A.1.3. *Ecuaciones de hidrólisis de Fe^{3+} incluidas en la metodología.*



Los valores para las constantes de hidrólisis se obtienen de Lindsay, 1979.

A.2. CÁLCULO DE LIGANDO TOTAL (L_T); Fe-LIGADO (Fe_L) y Fe TOTAL (Fe_T) A PARTIR DE LAS ECUACIONES QUÍMICAS.

A.2.1. Concentración de Ligando Total (C_L)

El ligando total es igual a la suma de las especies formadas para el ligando libre más la suma de las especies formadas del Fe:Ligando:

$$C_L = \sum_{n=0}^{n=4} H_n L + \sum_{m=-1}^{m=1} FeH_m L \quad (A.13)$$

Se reordenan las ecs. A.1-A.7 en función de las especies formadas:

$$[HL^{3-}] = \beta_{HL} \cdot [L^{4-}] \cdot [H^+] \quad (A.14)$$

$$[H_2L^{2-}] = \beta_{H_2L} \cdot [L^{4-}] \cdot [H^+]^2 \quad (A.15)$$

$$[H_3L^-] = \beta_{H_3L} \cdot [L^{4-}] \cdot [H^+]^3 \quad (A.16)$$

$$[H_4L] = \beta_{H_4L} \cdot [L^{4-}] \cdot [H^+]^4 \quad (A.17)$$

$$[FeL^-] = \beta_{FeL} \cdot [L^{4-}] \cdot [Fe^{3+}] \quad (A.18)$$

$$[FeHL] = \beta_{FeHL} \cdot [L^{4-}] \cdot [Fe^{3+}] \cdot [H^+] \quad (A.19)$$

$$[Fe(OH)L^{2-}] = \beta_{FeLH_{-1}} \cdot [L^{4-}] \cdot [Fe^{3+}] \cdot [H^+]^{-1} \quad (A.20)$$

Se sustituyen las ecs. A.14-A.20 en la ec. 13:

$$C_L = [L^{4-}] + [HL^{3-}] + [H_2L^{2-}] + [H_3L^-] + [H_4L] + [FeL^-] + [FeHL] + [Fe(OH)L^{2-}] \quad (21)$$

$$C_L = [L^{4-}] + \beta_{HL} \cdot [L^{4-}] \cdot [H^+] + \beta_{H_2L} \cdot [L^{4-}] \cdot [H^+]^2 + \beta_{H_3L} \cdot [L^{4-}] \cdot [H^+]^3 + \beta_{H_4L} \cdot [L^{4-}] \cdot [H^+]^4 \\ + \beta_{FeL} \cdot [L^{4-}] \cdot [Fe^{3+}] + \beta_{FeHL} \cdot [L^{4-}] \cdot [Fe^{3+}] \cdot [H^+] + \beta_{FeLH_{-1}} \cdot [L^{4-}] \cdot [Fe^{3+}] \cdot [H^+]^{-1} \quad (A.22)$$

Se saca factor común:

$$C_L = [L^{4-}] \cdot \overbrace{\left\{ 1 + \beta_{HL} \cdot [H^+] + \beta_{H_2L} \cdot [H^+]^2 + \beta_{H_3L} \cdot [H^+]^3 + \beta_{H_4L} \cdot [H^+]^4 \right\}}^A \\ + [L^{4-}] \cdot [Fe^{3+}] \cdot \underbrace{\left\{ \beta_{FeL} + \beta_{FeHL} \cdot [H^+] + \beta_{FeLH_{-1}} \cdot [H^+]^{-1} \right\}}_B \quad (A.23)$$

Para simplificar la ecuación se utilizan los siguientes parámetros:

$$A = \left\{ 1 + \beta_{HL} \cdot [H^+] + \beta_{H_2L} \cdot [H^+]^2 + \beta_{H_3L} \cdot [H^+]^3 + \beta_{H_4L} \cdot [H^+]^4 \right\}$$

$$B = \left\{ \beta_{FeL} + \beta_{FeHL} \cdot [H^+] + \beta_{FeLH_{-1}} \cdot [H^+]^{-1} \right\}$$

De esta forma la expresión del Ligando total queda:

$$C_L = \underbrace{[L^{4-}] \cdot A}_{\text{Ligando}} + \underbrace{[L^{4-}] \cdot [Fe^{3+}] \cdot B}_{\text{Fe:Ligado}} \quad (A.24)$$

A.2.2. Concentración de Fe Total (C_M)

La concentración de Fe^{3+} total es la suma de las especies formadas de Fe:Ligando y de las especies de hidrólisis de Fe^{3+} que afecten a las constantes finales:

$$C_M = \sum_{p=-4}^{p=1} FeH_p + \sum_{m=-1}^{m=1} FeH_m L \quad (A.25)$$

Se ponen las ecuaciones A.8-A.11 en función de sus especies formadas.

$$[Fe(OH)^{2+}] = \beta_{FeH_{-1}} [Fe^{3+}] \cdot ([H^+])^{-1} \quad (A.26)$$

$$[Fe(OH)_2^+] = \beta_{FeH_{-2}} [Fe^{3+}] \cdot ([H^+]^2)^{-1} \quad (A.27)$$

Una vez calculada la concentración de cada especie para cada punto de la valoración, utilizando la ley de Beer se puede calcular una Absorbancia teórica teniendo en cuenta las especies involucradas con sus correspondientes coeficientes de extinción molar:

$$Abs_{teórica} = [FeL^{-}] \cdot \epsilon_{FeL} + [FeHL] \cdot \epsilon_{FeHL} + [Fe(OH)L^{2-}] \cdot \epsilon_{Fe(OH)L} \tag{A.42}$$

Para el cálculo de las constantes de estabilidad de Fe^{3+} con los diferentes agentes

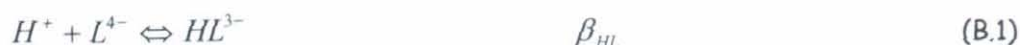
Opciones de Solver (Maleki et al., 1999)	
Tiempo	1000 sg.
Iteraciones	100
Precisión	0.000001
Tolerancia	0.001%
Convergencia	0.0001
Usar escala automática	
Estimación	Lineal
Derivadas	Progresivas
Hallar por	Newton

quelantes lo que se hace es, mediante la opción Solver de Microsoft Excel, hacer mínima la diferencia cuadrática, entre la Absorbancia experimental de la valoración y la Absorbancia teórica $\sum (Abs_{teórica} - Abs_{experimental})^2$, variando las constantes de estabilidad y los coeficientes de extinción molar de las especies, por sucesivas iteraciones.

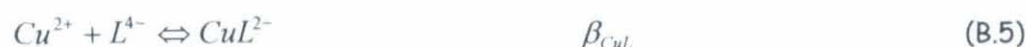
ANEXO B

(FUNDAMENTO TEÓRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS
CONSTANTES DE ESTABILIDAD Cu^{2+} -LIGANDO USANDO UN MÉTODO
ESPECTROFOTOMÉTRICO Y POTENCIOMÉTRICO SIMULTANEO)

B.1. ECUACIONES QUÍMICAS

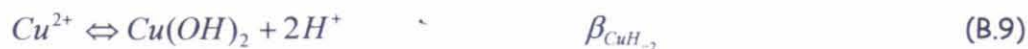
B.1.1. *Ligando*

Las constantes acumuladas de protonación se han calculado previamente utilizando métodos espectrofotométricos (para las constantes correspondientes a la disociación de los grupos fenólicos, L'Eplattenier et al. 1967)) y potenciométricos (grupos aminos y carboxílicos. Martell and Motekaitis, 1992)

B.1.2. *Cu-ligado*

Estas constantes son el objetivo de la metodología propuesta. Se usarán unas constantes teóricas basadas en la bibliografía, éstas serán utilizadas como semilla para, a través de sucesivas iteraciones, refinar y conseguir los valores finales.

B.1.3. *Ecuaciones de hidrólisis de Cu^{2+} incluidas en la metodología*



Los valores para las constantes de hidrólisis se obtienen de Lindsay, 1979.

B.2. CÁLCULO DE LIGANDO TOTAL (C_L): Cu-LIGADO (C_{ML}) Y Cu TOTAL (C_M) A PARTIR DE LAS ECUACIONES QUÍMICAS.

2.1. Concentración de Ligando Total (C_L)

El ligando total es igual a la suma de las especies formadas para el ligando libre más la suma de las especies formadas del Cu:Ligando:

$$C_L = \sum_{n=0}^{n=4} H_n L + \sum_{m=-1}^{m=1} CuH_m L \quad (B.13)$$

Se reordenan las ec. B.1-B.7 en función de las especies formadas:

$$[HL^{3-}] = \beta_{HL} \cdot [L^{4-}] \cdot [H^+] \quad (B.14)$$

$$[H_2L^{2-}] = \beta_{H_2L} \cdot [L^{4-}] \cdot [H^+]^2 \quad (B.15)$$

$$[H_3L^-] = \beta_{H_3L} \cdot [L^{4-}] \cdot [H^+]^3 \quad (B.16)$$

$$[H_4L] = \beta_{H_4L} \cdot [L^{4-}] \cdot [H^+]^4 \quad (B.17)$$

$$[CuL^{2-}] = \beta_{CuL} \cdot [L^{4-}] \cdot [Cu^{2+}] \quad (B.18)$$

$$[CuHL^-] = \beta_{CuHL} \cdot [L^{4-}] \cdot [Cu^{2+}] \cdot [H^+] \quad (B.19)$$

$$[CuH_2L] = \beta_{CuH_2L} \cdot [L^{4-}] \cdot [Cu^{2+}] \cdot [H^+]^2 \quad (B.20)$$

Se sustituyen las ecs. B.14-B.20 en la ec. B.13:

$$C_L = [L^{4-}] + [HL^{3-}] + [H_2L^{2-}] + [H_3L^-] + [H_4L] + [CuL^{2-}] + [CuHL^-] + [CuH_2L] \quad (B.21)$$

$$C_L = [L^{4-}] + \beta_{HL} \cdot [L^{4-}] \cdot [H^+] + \beta_{H_2L} \cdot [L^{4-}] \cdot [H^+]^2 + \beta_{H_3L} \cdot [L^{4-}] \cdot [H^+]^3 + \beta_{H_4L} \cdot [L^{4-}] \cdot [H^+]^4 \\ + \beta_{CuL} \cdot [L^{4-}] \cdot [Cu^{2+}] + \beta_{CuHL} \cdot [L^{4-}] \cdot [Cu^{2+}] \cdot [H^+] + \beta_{CuH_2L} \cdot [L^{4-}] \cdot [Cu^{2+}] \cdot [H^+]^2 \quad (B.22)$$

Se saca factor común:

$$C_L = [L^{4-}] \cdot \overbrace{\left\{ 1 + \beta_{HL} \cdot [H^+] + \beta_{H_2L} \cdot [H^+]^2 + \beta_{H_3L} \cdot [H^+]^3 + \beta_{H_4L} \cdot [H^+]^4 \right\}}^A \\ + [L^{4-}] \cdot [Cu^{2+}] \cdot \underbrace{\left\{ \beta_{CuL} + \beta_{CuHL} \cdot [H^+] + \beta_{CuH_2L} \cdot [H^+]^2 \right\}}_B \quad (B.23)$$

Para simplificar la ecuación se utilizan los siguientes parámetros:

$$A = \left\{ 1 + \beta_{HL} \cdot [H^+] + \beta_{H_2L} \cdot [H^+]^2 + \beta_{H_3L} \cdot [H^+]^3 + \beta_{H_4L} \cdot [H^+]^4 \right\} \\ B = \left\{ \beta_{CuL} + \beta_{CuHL} \cdot [H^+] + \beta_{CuH_2L} \cdot [H^+]^2 \right\}$$

De esta forma la expresión del Ligando total queda:

$$C_L = \underbrace{[L^{4-}] \cdot A}_{\text{Ligando}} + \underbrace{[L^{4-}] \cdot [Cu^{2+}] \cdot B}_{\text{CuLigado}} \quad (B.24)$$

2.2. Concentración de Cu Total (C_M)

La concentración de Cu^{2+} total es igual a la suma de las especies formadas de Cu:Ligado y de las especies de hidrólisis de Cu^{2+} que afecten a las constantes finales.

$$C_M = \sum_{p=-4}^{p=-1} CuH_p + \sum_{m=-1}^{m=1} CuH_m L \quad (B.25)$$

Se ponen las reacciones B.8-B.11 en función de sus especies formadas.

$$[Cu(OH)^+] = \beta_{CuH_{-1}} [Cu^{2+}] \cdot ([H^+])^{-1} \quad (B.26)$$

$$[Cu(OH)_2] = \beta_{CuH_{-2}} [Cu^{2+}] \cdot ([H^+])^{-2} \quad (B.27)$$

$$[Cu(OH)_3^-] = \beta_{CuH_{-3}} [Cu^{2+}] \cdot ([H^+])^{-3} \quad (B.28)$$

$$[Cu(OH)_4^{2-}] = \beta_{CuH_{-4}} [Cu^{2+}] \cdot ([H^+])^{-4} \quad (B.29)$$

Se sustituye en la ec. B.25 por la expresión de cada especie:

$$C_M = [Cu^{2+}] + [Cu(OH)^+] + [Cu(OH)_2] + [Cu(OH)_3^-] + [Cu(OH)_4^{2-}] + \underbrace{[L^{4-}] \cdot [Cu^{2+}] \cdot B}_{CuLigado} \quad (B.30)$$

Se sustituye cada especie por su expresión de la constante acumulada:

$$C_M = [Cu^{2+}] + \beta_{CuH_{-1}} [Cu^{2+}] \cdot ([H^+])^{-1} + \beta_{CuH_{-2}} [Cu^{2+}] \cdot ([H^+])^{-2} + \beta_{CuH_{-3}} [Cu^{2+}] \cdot ([H^+])^{-3} + \beta_{CuH_{-4}} [Cu^{2+}] \cdot ([H^+])^{-4} + \underbrace{[L^{4-}] \cdot [Cu^{2+}] \cdot B}_{CuLigado} \quad (B.31)$$

Se saca factor común el Cu libre de cada especie:

$$C_M = [Cu^{2+}] \cdot \{ 1 + \beta_{CuH_{-1}} \cdot ([H^+])^{-1} + \beta_{CuH_{-2}} \cdot ([H^+])^{-2} + \beta_{CuH_{-3}} \cdot ([H^+])^{-3} + \beta_{CuH_{-4}} \cdot ([H^+])^{-4} \} + \underbrace{[L^{4-}] \cdot [Cu^{2+}] \cdot B}_{CuLigado} \quad (B.32)$$

Para simplificar el término final se define el término C en función del pH y de las constantes de formación:

$$C = 1 + \beta_{CuH_{-1}} \cdot ([H^+])^{-1} + \beta_{CuH_{-2}} \cdot ([H^+])^{-2} + \beta_{CuH_{-3}} \cdot ([H^+])^{-3} + \beta_{CuH_{-4}} \cdot ([H^+])^{-4} \quad (B.33)$$

Expresión final del Cu_T:

$$C_M = \underbrace{[Cu^{2+}] \cdot C}_{CuLibre} + \underbrace{[L^{4-}] \cdot [Cu^{2+}] \cdot B}_{CuLigado} \quad (B.34)$$

Se hace un resumen de las expresiones obtenidas hasta el momento:

$$\begin{cases} C_L = [L^{4-}] \cdot A + [L^{4-}] \cdot [Cu^{2+}] \cdot B & (B.35) \\ C_{ML} = [L^{4-}] \cdot [Cu^{2+}] \cdot B & (B.36) \end{cases}$$

$$\begin{cases} C_M = [Cu^{2+}] \cdot C + [L^{4-}] \cdot [Cu^{2+}] \cdot B & (B.37) \end{cases}$$

Parámetros conocidos: C_L, C_M

Parámetros desconocidos: $C_{ML}, [Fe^{3+}], [L^{4-}]$

Se despeja la ecuación B.35 en función de L^{4-} :

$$[L^{4-}] = \frac{C_L}{A + [Cu^{2+}] \cdot B} \quad (B.38)$$

Se sustituye la expresión de L^{4-} en la ec. B.37:

$$C_M = [Cu^{2+}] \cdot C + \frac{C_L}{A + [Cu^{2+}] \cdot B} \cdot [Cu^{2+}] \cdot B \quad (B.39)$$

Se ordena la ecuación y se expresa como ecuación de 2º grado:

$$0 = [Cu^{2+}]^2 \cdot B \cdot C + \underbrace{\{C_L \cdot B + C \cdot A - C_M \cdot B\}}_D \cdot [Cu^{2+}] - C_M \cdot A \quad (B.40)$$

Se aplica la ecuación de resolución para ecuaciones de 2º grado:

$$[Cu^{2+}] = \frac{-D \pm \sqrt{D^2 + 4 \cdot B \cdot C \cdot C_M \cdot A}}{2 \cdot B \cdot C} \quad (B.41)$$

Con dos de las incógnitas resueltas ($[Fe^{3+}]$ y $[L^{4-}]$), se determina C_{ML} para cada valor de pH obtenido en la valoración y en función de cada especie (ecs. B.18-B.20).

$$\left. \begin{aligned} [CuL^{2-}] &= \beta_{CuL} \cdot [L^{4-}] \cdot [Cu^{2+}] \\ [CuHL^{-}] &= \beta_{CuHL} \cdot [L^{4-}] \cdot [Cu^{2+}] \cdot [H^{+}] \\ [CuH_2L] &= \beta_{CuLH_2} \cdot [L^{4-}] \cdot [Cu^{2+}] \cdot [H^{+}]^2 \end{aligned} \right\} C_{ML} = [CuL^{2-}] + [CuHL^{-}] + [CuH_2L]$$

Una vez calculada la concentración de cada especie para cada punto de la valoración, utilizando la ley de Beer se puede calcular una Absorbancia teórica teniendo en cuenta las especies involucradas con sus correspondientes coeficientes de extinción molar:

$$Abs_{teórica} = [CuL^{2-}] \cdot \varepsilon_{CuL} + [CuHL^{-}] \cdot \varepsilon_{CuHL} + [CuH_2L] \cdot \varepsilon_{CuH_2L} \tag{B.42}$$

Para el cálculo de las constantes de estabilidad de Cu(II) con los diferentes


Opciones de Solver (Maleki y col., 1999)	
Tiempo	1000 sg.
Iteraciones	100
Precisión	0.000001
Tolerancia	0.001%
Convergencia	0.0001
Usar escala automática	
Estimación	Lineal
Derivadas	Progresivas
Hallar por	Newton


agentes quelantes lo que se hace es, mediante la opción Solver de Microsoft Excel, hacer mínima la diferencia cuadrática, entre la Absorbancia experimental de la valoración y la Absorbancia teórica $\sum (Abs_{teórica} - Abs_{experimental})^2$, variando las constantes de estabilidad y los coeficientes de extinción molar de las diferentes especies, por sucesivas iteraciones.

Reunido el tribunal que suscribe en el día
de la fecha, acordó calificar la presente Tesis
doctoral con Sobresaliente cum Laude.

MADRID

18/7/03


Margarito Tuñer



Antonio Sánchez Miroglio


A. Garate

PR: AGUSTÍN GARATE ORMAECHEA


Juan Sánchez Andreu

Juan Sánchez Andreu


Mengüez Colles.
Secretario.